



## **Tesis Doctoral**

### **Resistencia a la sharka (*Plum pox virus*) en especies frutales del género *Prunus***

**Directores**

**Dr. Federico Dicenta López-Higuera**

**Dr. Pedro Martínez Gómez**

**Manuel Rubio Angulo**

**Ingeniero Agrónomo**

**Murcia, 2006**



## ÍNDICE GENERAL

<b>1. ANTECEDENTES, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	3
1.1. El cultivo de frutales del género <i>Prunus</i> .....	3
1.1.1. Descripción taxonómica y botánica.....	3
1.1.2. Origen y situación actual del cultivo .....	5
1.2. El virus causante de la sharka .....	10
1.2.1. Taxonomía y descripción del virus .....	10
1.2.2. Origen y situación actual de la virosis en España.....	14
1.2.3. Detección y localización del virus .....	14
1.2.4. Epidemiología y control de la virosis.....	19
1.3. Susceptibilidad varietal, sintomatología y fuentes de resistencia.....	21
1.4. Justificación y objetivos .....	29
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	33
2.1. Material vegetal.....	33
2.1.1. Plantas indicadoras .....	34
2.1.2. Variedades de frutales del género <i>Prunus</i> .....	35
2.1.2.1. Albaricoqueros .....	35
2.1.2.2. Ciruelos .....	38
2.1.2.3. Melocotoneros y nectarinas.....	40
2.1.2.4. Almendros .....	42
2.1.3. Patrones de frutales del género <i>Prunus</i> .....	45
2.1.4. Cruzamientos inter e intraespecíficos.....	48
2.1.4.1. Albaricoquero x albaricoquero .....	49
2.1.4.2. <i>P. mandshurica</i> x albaricoquero .....	50
2.1.4.3. Melocotonero x almendro.....	50
2.2. Aislado del <i>Plum pox virus</i> .....	51
2.3. Evaluación de la resistencia a la sharka.....	51
2.3.1. Evaluación en condiciones controladas en invernadero .....	52
2.3.2. Evaluación en condiciones de campo.....	57
2.4. Técnicas de detección del virus .....	58
2.4.1. ELISA-DASI .....	58
2.4.2. Hibridación molecular no radioactiva .....	59
2.4.3. RT-PCR .....	60
2.5. Localización del virus .....	62
2.5.1. Inmunoimpresión de la proteína de la cápsida .....	62
2.5.2. Impresión del ácido nucleico.....	63
2.6. Clasificación del nivel de resistencia.....	64

<b>3. EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA SHARKA EN ESPECIES DEL GÉNERO <i>PRUNUS</i></b> .....	69
3.1. Introducción .....	69
3.2. Material ensayado .....	73
3.3. Metodología .....	74
3.3.1. Comparación de las técnicas de detección del virus .....	74
3.3.2. Comparación de las técnicas de localización del virus en los tejidos .	74
3.3.3. Estudio del movimiento del virus a larga distancia .....	75
3.3.4. Evaluación de la resistencia en invernadero y en campo .....	77
3.3.5. Optimización de la evaluación de la resistencia en invernadero.....	77
3.4. Resultados y discusión .....	78
3.4.1. Comparación de las técnicas de detección del virus .....	78
3.4.2. Comparación de las técnicas de localización del virus en los tejidos .	81
3.4.3. Estudio del movimiento del virus a larga distancia .....	86
3.4.4. Comparación de la evaluación en invernadero y campo .....	89
3.4.5. Optimización de la evaluación de la resistencia en invernadero.....	94
3.5. Conclusiones .....	102
<b>4. COMPORTAMIENTO FRENTE A LA SHARKA EN ESPECIES DEL GÉNERO <i>PRUNUS</i></b> .....	105
4.1. Introducción .....	105
4.2. Material ensayado .....	106
4.3. Metodología .....	107
4.4. Resultados y discusión .....	108
4.4.1. Variedades de frutales del género <i>Prunus</i> .....	108
4.4.1.1. Albaricoqueros .....	108
4.4.1.2. Ciruelos .....	112
4.4.1.3. Melocotoneros y nectarinas .....	114
4.4.1.4. Almendros .....	118
4.4.2. Patrones de frutales del género <i>Prunus</i> .....	121
4.5. Conclusiones .....	128
<b>5. TRANSMISIÓN DE LA RESISTENCIA A LA SHARKA EN ESPECIES DEL GÉNERO <i>PRUNUS</i></b> .....	131
5.1. Introducción .....	131
5.2. Material ensayado .....	134
5.3. Metodología .....	135
5.3.1. Evaluación de la resistencia .....	135
5.3.2. Hipótesis de herencia y análisis estadístico.....	135
5.4. Resultados y discusión .....	136
5.4.1. Herencia de la resistencia en albaricoquero.....	136
5.4.2. <i>Prunus mandshurica</i> como fuente de resistencia en albaricoquero .....	142
5.4.3. El almendro como fuente de resistencia en melocotonero .....	144
5.5. Conclusiones .....	148

<b>6. RESUMEN Y CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	151
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	157
<b>8. ANEXOS</b> .....	179
1. Cultivo de plantas en invernadero.....	179
2. Técnica ELISA-DASI .....	180
3. Hibridación molecular no radioactiva.....	182
3.1. Síntesis de la sonda .....	182
3.2. Hibridación molecular no radioactiva .....	183
4. Extracción de ARN con Kit Qiagen® .....	185
5. Técnica RT-PCR .....	186
6. Inmunoimpresión para la localización de la proteína del virus .....	188
7. Impresión para la localización del ácido nucleico del virus .....	190
8. Tablas optimización de la evaluación de la resistencia en invernadero .....	192



## INDICE DE TABLAS

### **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

<b>Tabla 2.1.</b> Clasificación botánica y uso agrícola de las especies del género <i>Prunus</i> estudiadas.....	33
--	----

### **3. EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA SHARKA EN ESPECIES DEL GÉNERO PRUNUS**

<b>Tabla 3.1.</b> Comparación de tres métodos diferentes para la detección del PPV: ELISA-DASI, hibridación molecular no radioactiva y RT-PCR .....	80
---	----

<b>Tabla 3.2.</b> Verificación de la presencia de sharka mediante observación visual de síntomas y la técnica ELISA-DASI .....	82
--	----

<b>Tabla 3.3.</b> Localización del PPV en secciones de tallo y pecíolo en diferentes especies del género <i>Prunus</i> mediante inmunopresión (proteína) e hibridación molecular (ARN) colorimétrica y quimioluminiscente .....	83
---	----

<b>Tabla 3.4.</b> Localización del PPV (proteína de la cápsida y ácido nucleico ) en los tejidos de los tallos y pecíolos de diferentes especies del género <i>Prunus</i> . Porcentajes de impresiones infectadas en los diferentes tejidos de las secciones.....	84
---	----

<b>Tabla 3.5.</b> Efecto de la variedad en el movimiento del virus a larga distancia. 'Modelo 1' la inoculación se realizó en el patrón 'GF305', en el 'Modelo 2' se llevo a cabo inoculando mediante yemas de 'GF305' enfermo, sobre las variedades.....	86
---	----

<b>Tabla 3.6.</b> Comparación de la evaluación de híbridos de albaricoquero en condiciones controladas de inoculación en invernadero y en condiciones de campo. ....	90
--	----

<b>Tabla 3.7.</b> Número de errores cometidos sobre el total de plantas evaluadas en invernadero, campo y en ambos conjuntamente .....	92
--	----

<b>Tabla 3.8.</b> Eficiencia en la injerta de variedades 'GF305', 'Real Fino' y 'Stark Early Orange' ('SEO'), sobre dos patrones francos ('GF305' y 'Real Fino'), según los dos modelos de evaluación estudiados (Modelo-1 inoculación en el patrón. Modelo-2 inoculación en la variedad), en 4 injertas diferentes (Injertas 1 y 3, primavera. Injertas 2 y 4, otoño).....	96
---	----

<b>Tabla 3.9.</b> Eficiencia en la inoculación sobre el patrón 'GF305' o 'Real Fino' (Modelo 1) y sobre la variedad 'GF305', 'Real Fino' o 'Stark Early Orange' ('SEO') (Modelo 2) .....	98
--	----

<b>Tabla 3.10.</b> Eficiencia en la evaluación de la susceptibilidad a la sharka de las variedades 'GF305', 'Real Fino' y 'Stark Early Orange' (SEO), sobre dos patrones francos ('GF305' y 'Real Fino'), según los dos modelos de evaluación estudiados (Modelo-1 inoculación del patrón. Modelo-2 inoculación de la variedad), a lo largo de 4 ciclos de crecimiento artificial.....	101
--	-----

#### **4. COMPORTAMIENTO FRENTE A LA SHARKA EN ESPECIES DEL GÉNERO PRUNUS**

<b>Tabla 4.1.</b> Evaluación de la resistencia al <i>Plum pox virus</i> de distintas variedades de albaricoquero .....	109
<b>Tabla 4.2.</b> Evaluación de la resistencia al <i>Plum pox virus</i> de distintas variedades de ciruelo.....	113
<b>Tabla 4.3.</b> Evaluación de la resistencia al <i>Plum pox virus</i> de distintas variedades de melocotonero .....	116
<b>Tabla 4.4.</b> Evaluación de la resistencia al <i>Plum pox virus</i> de distintas variedades de almendro .....	119
<b>Tabla 4.5.</b> Evaluación de la resistencia al <i>Plum pox virus</i> de distintos patrones de <i>Prunus</i> .....	123
<b>Tabla 4.6.</b> Resumen del comportamiento frente a la sharka de las variedades y patrones de <i>Prunus</i> evaluados .....	127

#### **5. TRANSMISIÓN DE LA RESISTENCIA A LA SHARKA EN ESPECIES DEL GÉNERO PRUNUS**

<b>Tabla 5.1.</b> Evaluación de la resistencia al <i>Plum pox virus</i> de las variedades de albaricoquero 'Stark Early Orange' (SEO) y 'Polonais', y los descendientes de los cruzamientos entre ellas .....	136
<b>Tabla 5.2.</b> Transmisión de la resistencia en tres familias de albaricoquero .....	140
<b>Tabla 5.3.</b> Evaluación de la resistencia al <i>plum pox virus</i> de 12 descendientes de <i>P. mandshurica</i> x 'Currot' y de sus genitores .....	143
<b>Tabla 5.4.</b> Evaluación de la resistencia al <i>Plum pox virus</i> de los descendientes de cruzamientos interespecíficos almendro x melocotonero, melocotonero x almendro y algunos de sus progenitores.....	146



## INDICE DE FIGURAS

### **1. ANTECEDENTES, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

<b>Figura 1.1.</b> Principales países productores de albaricoque. Producción media durante el periodo 2000-2004 (FAO, 2005). .....	6
<b>Figura 1.2.</b> Principales países productores de ciruela. Producción media durante el periodo 2000-2004 (FAO, 2005). .....	7
<b>Figura 1.3.</b> Principales países productores de melocotón. Producción media durante el periodo 2000-2004 (FAO, 2005). .....	8
<b>Figura 1.4.</b> Principales países productores de almendra. Producción media durante el periodo 2000-2004 (FAO, 2005). .....	9
<b>Figura 1.5.</b> Principales países productores de cereza. Producción media durante el periodo 2000-2004 (FAO, 2005). .....	9
<b>Figura 1.6.</b> Representación esquemática del genoma del PPV (García <i>y col.</i> , 1994). •- Extremo 5´ VPg. Los productos proteicos codificados por cada región se indican debajo del genoma: P1 primera proteína, HC proteína del factor asistente, P3 tercera proteína, 6K <sub>1</sub> primer péptido 6K, CI proteína de inclusión celular, 6K <sub>2</sub> segundo péptido 6K, NIa proteína de inclusión nuclear "a", NIb proteína de inclusión nuclear "b", CP proteína de la cápsida .....	11
<b>Figura 1.7.</b> Partículas virales del PPV purificadas y tenidas con platino/iridio. La barra representa 500 nm.....	12
<b>Figura 1.8.</b> Síntomas de sharka en albaricoquero. A.- Clorosis nerviales en hoja. B.- Anillos cloróticos en hoja de albaricoquero. C.- Deformaciones en frutos.D.- Anillos sobre huesos .....	23
<b>Figura 1.9.</b> Síntomas de sharka en ciruelo y melocotonero. A.- Hojas de ciruelo con síntomas de la enfermedad. B.- Ciruela con fuertes manchas cloróticas de PPV. C.- Hojas de melocotonero con típicas clorosis nerviales. D.- Anillos cloróticos sobre piel de melocotón.....	25

### **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

<b>Figura 2.1.</b> Evaluación de la resistencia a la sharka en condiciones controladas en invernadero. A.-Invernadero a prueba de insectos donde se realiza la evaluación. B.- y C.- Exterior e interior de la cámara fría donde las plantas se someten a letargo artificial .....	54
<b>Figura 2.2.</b> Calendario del método de evaluación de la resistencia a la sharka en condiciones controladas en invernadero.....	56
<b>Figura 2.3.</b> Evaluación en condiciones de campo. A- Árbol enfermo de sharka sobre el que se injertó parte de las plantas a evaluar. B- Detalle del injerto tipo "púa" utilizado para la evaluación de los híbridos en campo.....	57

### 3. EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA SHARKA EN ESPECIES DEL GÉNERO *PRUNUS*

**Figura 3.1.** Plantas modelo utilizadas para los estudios de movimiento del virus a larga distancia. Modelo 1: Inoculación con corteza en el patrón 'GF305'. Modelo 2: Inoculación mediante yema de 'GF305' infectada sobre la variedad a evaluar ..... 76

**Figura 3.2.** Comparación de la sensibilidad ELISA-DASI, hibridación molecular y RT-PCR en un ensayo de diluciones de melocotonero 'GF305' y albaricoquero 'Real fino' en tejidos inoculados con PPV que mostraban fuertes síntomas de la enfermedad. M.- Marcador de peso molecular (1Kb, Invitrogen)..... 79

**Figura 3.3.** Localización del PPV en tejidos de tallo y peciolo. A.- Revelado colorimétrico de las membranas de nitrocelulosa (izquierda) y nylon (derecha), en el centro quimioluminiscente (nylon). B.- Impresión de un tallo de *Nicotiana* sin inocular. C.- Detalle de la impresión de un tallo de *Nicotiana* infectada. D.- Impresión de peciolo de 'GF305' infectado, con presencia de PPV en cortex y epidermis. E.- Detalle de tallo de 'GF305' infectado, con el virus localizado en el esclerénquima... 85

**Figura 3.4.** RT-PCR de las variedades, Modelo-1: calle 1. GF305-1, 2. GF305-2, 3. GF305-3, 4. R. Fino-1, 5. R. Fino-2, 6. R. Fino-3, 7. SEO-1, 8. SEO-2, 9. SEO-3. Modelo-2: calle 10. GF305-1, 11. GF305-2, 12. R. Fino-1, 13. R. Fino-2, 14. SEO-1, 15. SEO-2, 16. Testigo positivo de melocotonero GF305. M marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen). Tamaño de la banda indicativa de la presencia de PPV (313 pb). ..... 88

### 4. COMPORTAMIENTO FRENTE A LA SHARKA EN ESPECIES DEL GÉNERO *PRUNUS*

**Figura 4.1.** Diferentes variedades de *Prunus*. A.- Síntomas en albaricoquero 'Dorada'. B.- Resistencia del albaricoquero 'Henderson'. C.- Fuerte sintomatología en ciruelo 'Golden Japan'. D.- Detalle de clorosis nerviales en ciruelo 'Santa Rosa'. E.- Detalle de la leve clorosis nervial producida en melocotonero 'Big Top'. F.- Resistencia del almendro 'Marta'.. ..... 111

**Figura 4.2.** Productos de amplificación (243 bp) indicativos de la presencia de PPV. Calle 1. Patrón GF305 sano, Calle 2. Patrón GF305 infectado con PPV mostrando fuertes síntomas de sharka, Calles 3-11: 3. 'Marta', 4. 'Nonpareil', 5. 'Ferragnes', 6. 'Marcona', 7. 'Ramillete', 8. 'Lauranne', 9. 'Guara', 10. 'Antoñeta' y 11. 'Garrigues'. Calle M. marcador de peso molecular 100 pb(Gibco BRL). .....121

**Figura 4.3.** Productos de amplificación (313 bp) indicativos de la presencia de PPV, obtenidos usando RT-PCR para la detección de PPV en diferentes muestras. Calle 1. Patrón 'GF305' sano, Calle 2. 'GF305' patrón infectado con PPV mostrando fuertes síntomas de sharka, Calles 3-11: 3. 'CP-2', 4. 'GF677', 5. 'L-2', 6. 'Myrobolan 29C', 7. 'Nemared', 8. 'Nemaguard', 9. 'Montclar', 10. 'Evrica' y 11. 'Real Fino'. Calle M. marcador de peso molecular 1 Kb (Gibco BRL). .....124

**Figura 4.4.** Síntomas de sharka en diferentes patrones de *Prunus*. A.- 'Real Fino'. B.- 'Montclar'. C.- 'CP-2'. D.- 'AC9921-07'. E.- 'Evrica'. F.- 'Nemaguard'. .....125

## 5. TRANSMISIÓN DE LA RESISTENCIA A LA SHARKA EN ESPECIES DEL GÉNERO *PRUNUS*

**Figura 5.1.** Detalle de dos de los descendientes evaluados del cruzamiento 'Polonais' x 'Stark Early Orange'. Podemos observar los fuertes síntomas de PPV mostrados por uno de los descendientes evaluados (izquierda) en comparación con el otro descendiente que mostró resistencia al virus (derecha)..... 137

**Figura 5.2.** Detalle de dos de los descendientes del cruzamiento *P. mandshurica* x 'Currot' (*Prunus armeniaca* L.) mostrando fuertes síntomas de PPV. .... 144

**Figura 5.3.** Detalle de dos de los descendientes evaluados de cruzamientos entre melocotonero y almendro evaluados. Podemos observar la resistencia (ausencia de síntomas) de las dos líneas de mejora 'F10C, 12-28' (izquierda) y 'F8,5-156' (derecha) injertadas sobre 'GF305', el cual si presenta fuertes síntomas de la enfermedad..... 147





# **1. Antecedentes, justificación y objetivos**



## 1. ANTECEDENTES, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

### 1.1. EL CULTIVO DE FRUTALES DEL GÉNERO PRUNUS

#### 1.1.1. Descripción taxonómica y botánica

La familia *Rosaceae* es una familia monofilum perteneciente al orden de las *Rosales*, con un gran interés a nivel botánico debido al gran número de especies con uso agrícola que posee. Entre los 95 géneros que componen esta familia podemos destacar los géneros *Malus* (manzanos), *Pyrus* (perales), *Fragaria* (fresas), *Rosa* (rosas) y *Prunus* (frutales de hueso). El género *Prunus* también es uno de los más importantes desde el punto de vista agrícola, con más de 20 especies ampliamente cultivadas en todo el mundo de las 120 descritas (Bailey y col., 1975). Este género se divide en 5 grandes subgéneros: *Prunus* (albaricoqueros y ciruelos), *Amygdalus* (melocotoneros y almendros) y *Cerasus* (cerezos) con un gran interés desde el punto de vista agrícola, además de los subgéneros *Laurocerasus* y *Padus* que no poseen especies de interés agrícola (Lee y Wen, 2001).

La especie albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.) tiene su centro primario de origen y diversidad en el noroeste de China y algunas áreas secundarias en el Asia Central. Es un árbol que alcanza los 7-8 metros de altura, con la corteza pardo-rojiza. Las hojas son simples, ovales o redondeadas, con el ápice agudo, dentadas en los márgenes, poseen el pecíolo largo y con glandulitas cerca de la base del limbo. El fruto es una drupa globosa, carnosa de color amarillento a anaranjado con chapa de color rojizo en la zona expuesta al sol. Los frutos son muy apreciados para consumo en fresco, así como para mermeladas, confituras, zumos y desecados (orejones).

El ciruelo cultivado se clasifica en dos grandes grupos, el ciruelo europeo (*Prunus domestica* L.) y el ciruelo japonés (*Prunus salicina* Lindl), con distintos centros de diversidad. El primero se considera un hexaploide natural procedente



de la hibridación entre *Prunus cerasifera* Ehrh. y *Prunus spinosa* L. en la zona de Caucasia, donde estas especies se encuentran espontáneamente. Los ciruelos europeos presentan árboles de hasta 7 metros, con hojas lanceoladas o elipsoidales, pubescentes sobre todo en el envés, con estípulas lineales y persistentes. El fruto es de oblongo a esférico, con una amplia gama de coloraciones. Por otro lado, los ciruelos japoneses tienen su centro primario de diversidad en bosques del norte de China, con un centro secundario en Japón (Zeven y De Wet, 1993). Los ciruelos japoneses presentan árboles de hasta 5 metros, con las hojas simples, alternas, oblongo-ovadas, con el margen finamente aserrado y pilosas por el envés. El fruto es una drupa globosa, de color amarillo o rojizo, están cubiertos por una película blanco azulada, con una pulpa de sabor ácido y muy dulce. Los frutos de los ciruelos se aprovechan para consumo en fresco, mermeladas y como pasas.

El melocotonero [*Prunus persica* (L.) Batsch.] procede de las regiones montañosas del Tibet y del suroeste de China, de donde pasó a la India, Persia y de ahí a la Cuenca Mediterránea. Es un árbol de 4 a 7 metros de altura. Las hojas son sencillas, alternas, oblongo-lanceoladas de consistencia herbácea, color verde-esmeralda limpio, con el margen ligeramente aserrado, nervio central marcado y pecíolos cortos. El fruto es una drupa muy carnosa, globosa, pubescente, con surco longitudinal marcado desde la base al ápice. Dentro de la especie existen diversos tipos de melocotoneros (carne blanca, amarilla, blanda, dura, etc.). Las nectarinas son un grupo incluido dentro de esta especie, pero la superficie del fruto es totalmente lisa y de carne más blanda. Se destina tanto para consumo en fresco como para procesado en mermeladas, zumos, almíbar, etc.

El almendro [*Prunus dulcis* (Miller) D.A. Webb] tiene su origen en la zona de Asia Occidental y Próximo Oriente, siendo la Cuenca Mediterránea un centro de diversidad secundario. El árbol es de buen porte, llegando a los 8-10 metros de altura. Las hojas son simples, verdes y brillantes por el haz, oblongo-lanceoladas y dentadas. Fruto en drupa, oblongo-comprimido, afelpado de color gris-verdoso, el hueso (la almendra) contiene la pepita, que en su núcleo es

blanca y aceitosa. Sus aprovechamientos son diversos consumiéndose en fresco, secas, tostadas y en innumerables dulces, pasteles, turrone y un largo etc.

El cerezo presenta dos grandes especies cultivadas, el cerezo dulce (*Prunus avium* L.), y el guindo o cerezo ácido (*Prunus cerasus* L.), ambas especies son naturales del sureste de Europa y oeste de Asia. El cerezo dulce tuvo su origen probablemente en el mar Negro y en el mar Caspio, difundiéndose después hacia Europa y Asia. El árbol presenta la corteza lisa, anillada, de color marrón rojizo, que se desprende de anchas bandas transversales. Presenta problemas de formación, debido a la dominancia apical (ramifica muy poco). Tiene las hojas simples, ovado-oblongas, con el margen irregularmente aserrado, haz glabro y envés más o menos pubescente y pecíolo de 4-5 cm de longitud, con 2-3 glándulas rojizas cerca del limbo. El fruto es de color rojo negruzco, globoso o con forma de corazón. El hueso es globoso, casi liso.

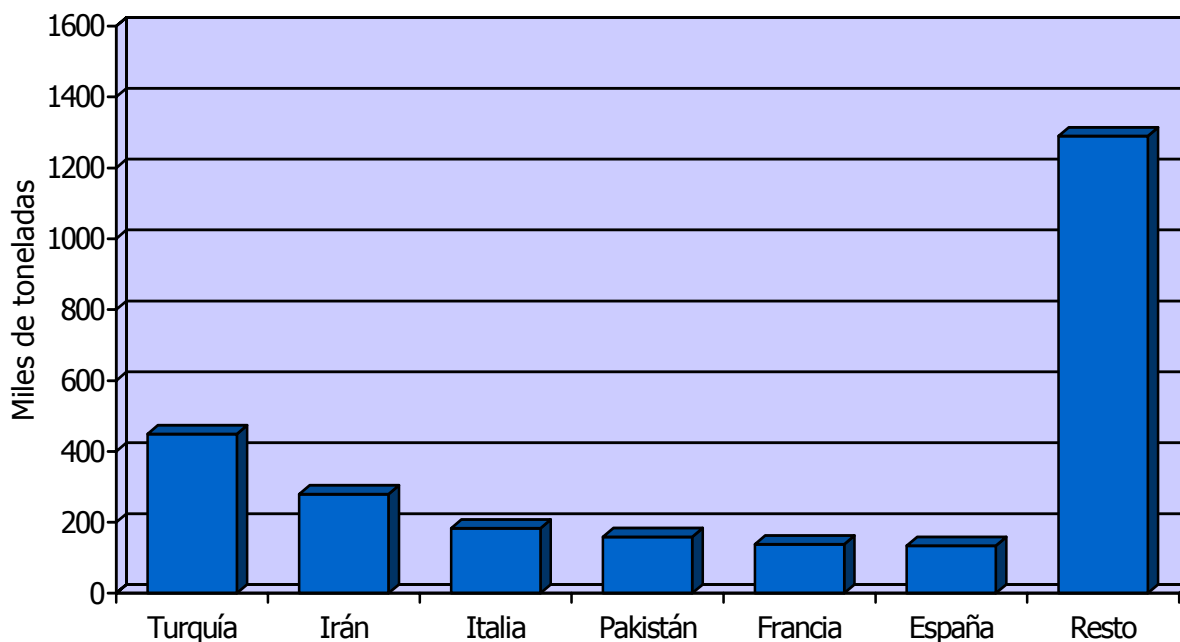
### **1.1.2. Origen y situación actual del cultivo**

Los frutales de hueso suponen una importante fuente de riqueza para nuestro país. De las 968.000 ha dedicadas al cultivo de frutales no cítricos, los frutales de hueso ocupan un 23%, con el 62% de la producción. Sólo la superficie dedicada al cultivo del almendro supone el 68% del total con un 6% de la producción total. Los principales frutales de hueso que se cultivan en la Región de Murcia son el albaricoquero, melocotonero, ciruelo y almendro.

**Albaricoquero:** La producción mundial de albaricoque se estima en unos 2.642.000 t. Los principales países productores son Turquía con 450.000 t, seguida de Irán (280.000 t), Italia (185.000 t), Pakistán (160.000 t), Francia (138.200 t) y España (134.100 t) (Figura 1.1.) (FAO, 2005).

En nuestro país, el cultivo del albaricoquero ocupa el tercer lugar en importancia tras el melocotonero y el ciruelo. Ocupa una superficie de 21.000 ha, de las cuales 10.000 ha se encuentran en la Comunidad Autónoma de

Murcia, 5.500 ha en Valencia y el resto en Castilla-La Mancha, Baleares, Aragón y Cataluña. La producción nacional se cifra en torno a las 127.000 t, destacando Murcia con un 65% (83.000 t) de la producción nacional, siendo la primera productora de albaricoque, seguida de Valencia (25.000 t) (MAPA, 2003).

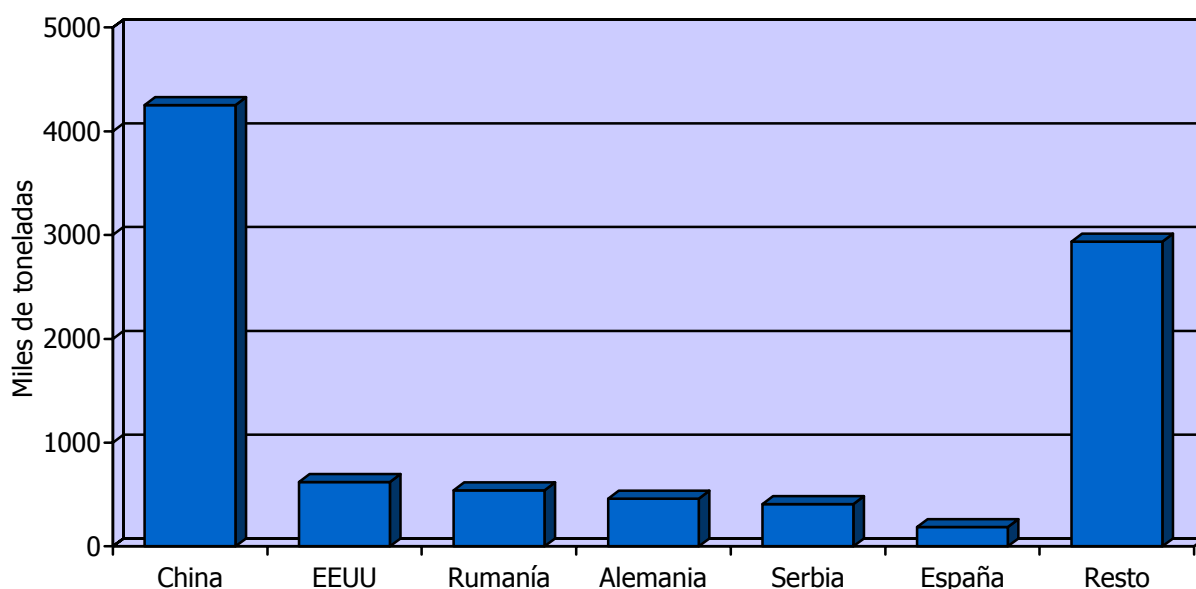


**Figura 1.1.** Principales países productores de albaricoque. Producción media durante el periodo 2000-2004 (FAO, 2005).

**Ciruelo:** La producción mundial de ciruela japonesa y europea se estima en unas 9.325.000 t. Los principales países productores son China (4.253.000 t), Estados Unidos (620.000 t), Rumanía (542.200 t), Alemania (460.000 t) y Serbia y Montenegro (561.000 t) (Figura 1.2). La producción también es importante en España con unas 186.000 t (FAO, 2005). En el ámbito nacional, el ciruelo es el segundo frutal de hueso más cultivado, detrás del melocotonero. La superficie dedicada al cultivo del ciruelo se encuentra en torno a las 19.000 ha (MAPA, 2003).

El ciruelo europeo se concentra principalmente en el Valle del Ebro y en La Rioja, ocupando una superficie del 30% y una producción del 25% sobre el total nacional y destinándose casi en su totalidad a la industria conservera. Respecto al ciruelo japonés y los híbridos americanos, su cultivo se extiende por todas las zonas frutícolas mediterráneas, destinándose la mayoría de su producción a la exportación.

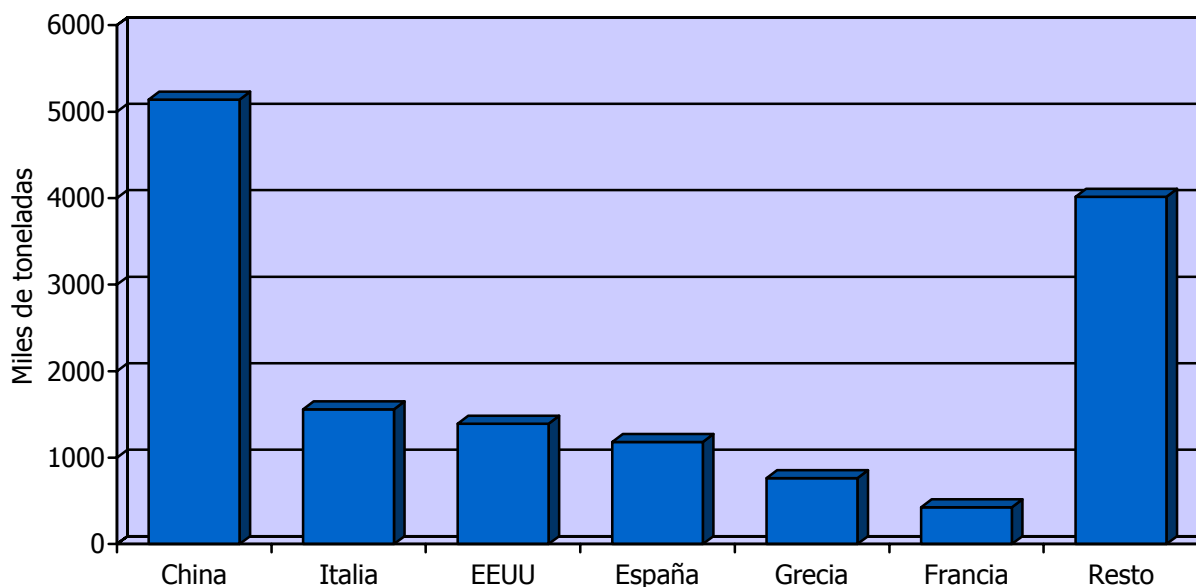
Extremadura es la principal productora de ciruela con unas 52.000 t, seguida de la Región de Murcia con 46.000 t, Comunidad que tradicionalmente ocupaba el primer puesto. Tras ésta encontramos la Comunidad Valenciana con unas 25.000 t (MAPA, 2003).



**Figura 1.2.** Principales países productores de ciruela. Producción media durante el periodo 2000-2004 (FAO, 2005).

**Melocotonero:** La producción mundial de melocotón y nectarina se estima en torno a las 15.400.000 t. Los principales países productores son China con 5.832.000 t, Italia (1.672.000 t) y Estados Unidos (1.390.000 t). Otros países productores son España con 1.106.000 t y Grecia con 955.000 t (Figura 1.3), (FAO, 2005).

En nuestro país, el cultivo del melocotonero ocupa una superficie de 77.000 ha, siendo el principal frutal de hueso. Aragón es la primera productora con 313.000 t, seguida de Murcia con 300.000 t y Cataluña con 258.000 t (MAPA, 2003).

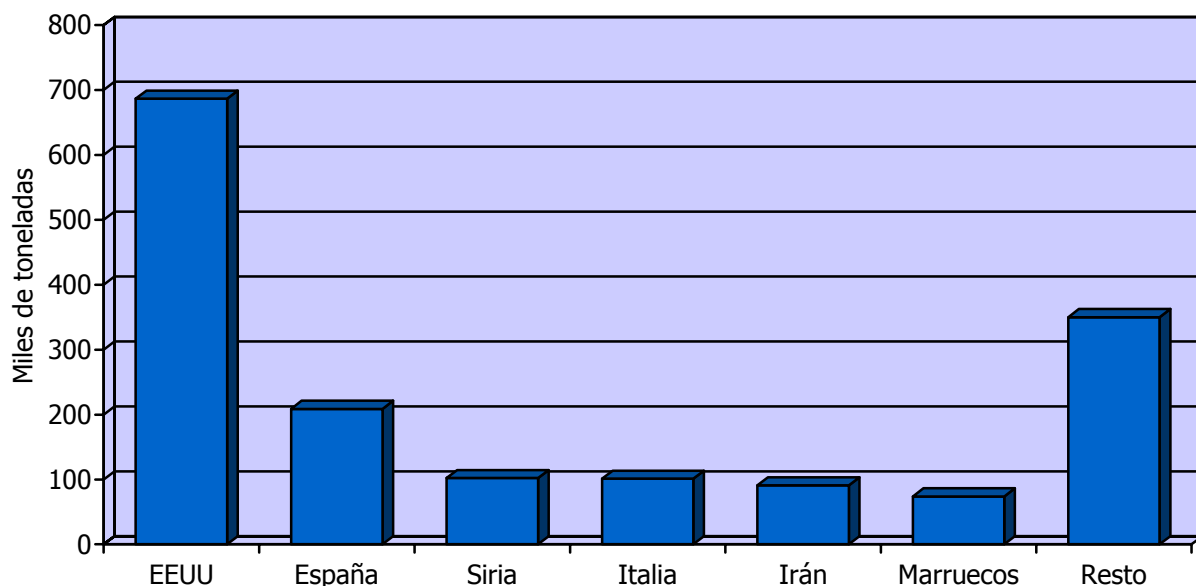


**Figura 1.3.** Principales países productores de melocotón. Producción media durante el periodo 2000-2004 (FAO, 2005).

**Almendro:** En el caso del almendro, Estados Unidos, con una producción media de cerca de 700.000 t al año, destaca como primer productor (45%), seguido de España (208.800 t), Siria (102.000 t), Italia (101.000 t) e Irán (90.000 t). Otros países productores de almendra de menor importancia son Marruecos y Grecia (Figura 1.4) (FAO, 2005).

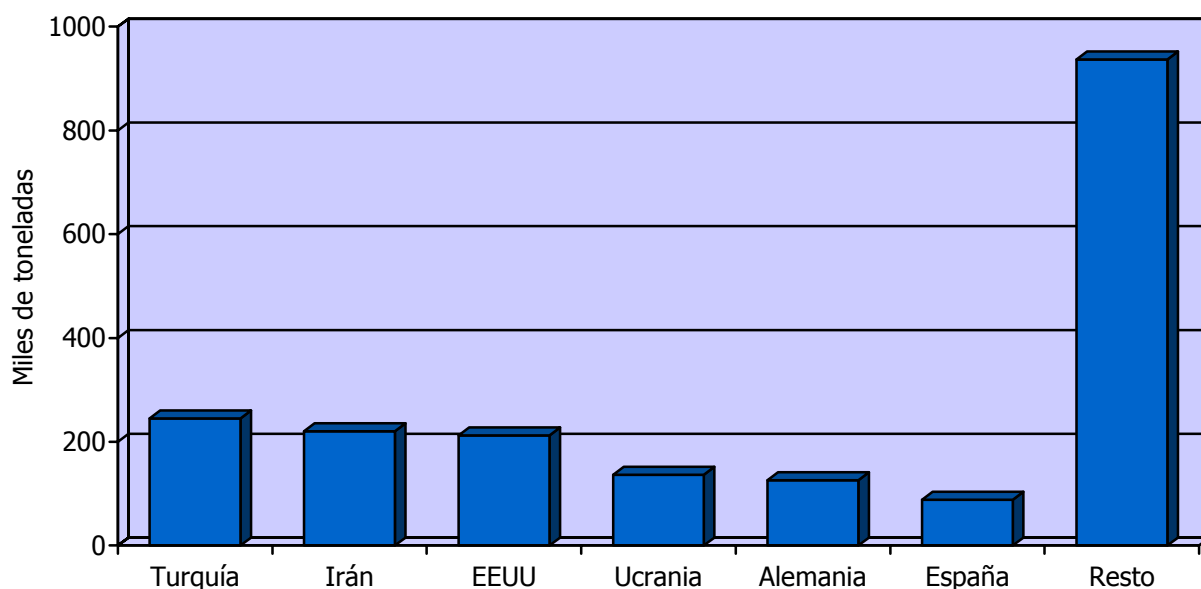
En nuestro país, este cultivo ocupa una superficie de 650.000 ha, concentrándose la producción en las Comunidades de Valencia con 65.000 t, Andalucía (64.000 t), Aragón (31.000 t) y Murcia (30.000 t) (MAPA, 2003).

**Cerezo:** La producción mundial de cerezo dulce y cerezo ácido o guindo se estima en unas 1.877.685 t. Los principales países productores son Turquía (245.000 t), Irán (220.646 t) y Estados Unidos (212.343 t), seguidos de Ucrania y Alemania. España produce unas 90.000 t anuales (Figura 1.5) (FAO, 2005).



**Figura 1.4.** Principales países productores de almendra. Producción media durante el periodo 2000-2004 (FAO, 2005).

En España se cultiva principalmente en Aragón y Extremadura, con una producción anual de 36.000 y 29.000 toneladas respectivamente. En las Comunidades de Valencia y Murcia la importancia de este cultivo es mucho menor que el resto de frutales de hueso (MAPA, 2003).



**Figura 1.5.** Principales países productores de cereza. Producción media durante el periodo 2000-2004 (FAO, 2005).

## 1.2. EL VIRUS CAUSANTE DE LA SHARKA

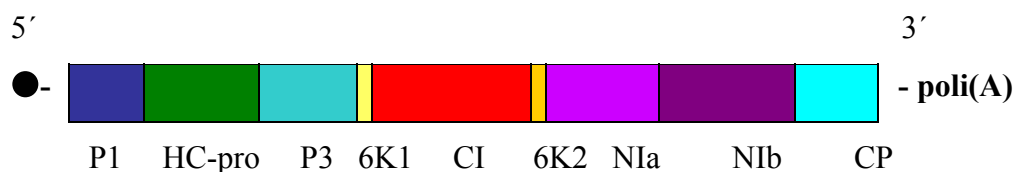
La sharka es una enfermedad de origen viral causada por el *Plum pox virus* (PPV). Afecta a la mayoría de las especies del género *Prunus*, fundamentalmente al albaricoquero, melocotonero y ciruelo (Morvan y Audergon, 1989; Németh, 1994; Roy y Smith, 1994). También ha sido descrita en cerezo (Kalashyan *y col.*, 1994); Creszenzi *y col.*, 1997) y experimentalmente ha sido transmitida al almendro (Dallot *y col.*, 1996). Giunchedi (1986) cita 18 especies del género *Prunus* como posibles hospedantes de este virus. Fuera de este género el PPV afecta a otras especies, sobre todo herbáceas, como *Nicotiana* sp. y *Chenopodium* sp. (Van Oosten, 1971; Németh, 1986).

La primera referencia que se tiene de este virus es en Bulgaria hacia 1917 (Atanassoff, 1932). Josifovic (1937) la describió en Yugoslavia bajo la denominación de mosaico del ciruelo, y fue Christof (1938) quien la detectó por primera vez en albaricoquero. Posteriormente se extendió por toda Europa (Morvan y Audergon, 1989; Németh, 1994; Roy y Smith, 1994; Smith *y col.*, 1994), y ha sido detectada en Egipto y Argelia (Dunez, 1988), India (Thakur *y col.*, 1992), Chile (Acuña, 1993), EEUU y Canadá (Levy, 2000) y más recientemente en Túnez (Boulila y Ravelonandro, 2004) y China (Navrátil *y col.*, 2005).

### 1.2.1.- Taxonomía y descripción del virus

El virus causante de la sharka pertenece al género de los *Potyvirus*, virus de plantas caracterizados por su estructura filamentosa (Ward y Shukla, 1991). Es uno de los grupos más importantes de los que afectan a los vegetales, con virus tan importantes como el virus Y de la patata (*Potato Y Virus*, PVY), el cual da nombre al género, o el virus del mosaico común de la judía (*Bean Common Mosaic Virus*, BCMV) (Barnett, 1990). Riechmann *y col.* (1992), identificaron más de 180 miembros de este género, de los cuales el 30% son conocidos virus de plantas que afectan a las plantas cultivadas.

El genoma del *Plum pox virus* (PPV) consiste en una cadena única de ARN con simetría helicoidal y polaridad positiva, con una proteína VPg en su extremo 5' y una cadena de poli(A) de longitud variable en el extremo 3'. Tiene una longitud de 680 a 900 nm y una anchura de 15 nm (Riechmann *y col.*, 1992; García *y col.*, 1994) (Figura 1.6).



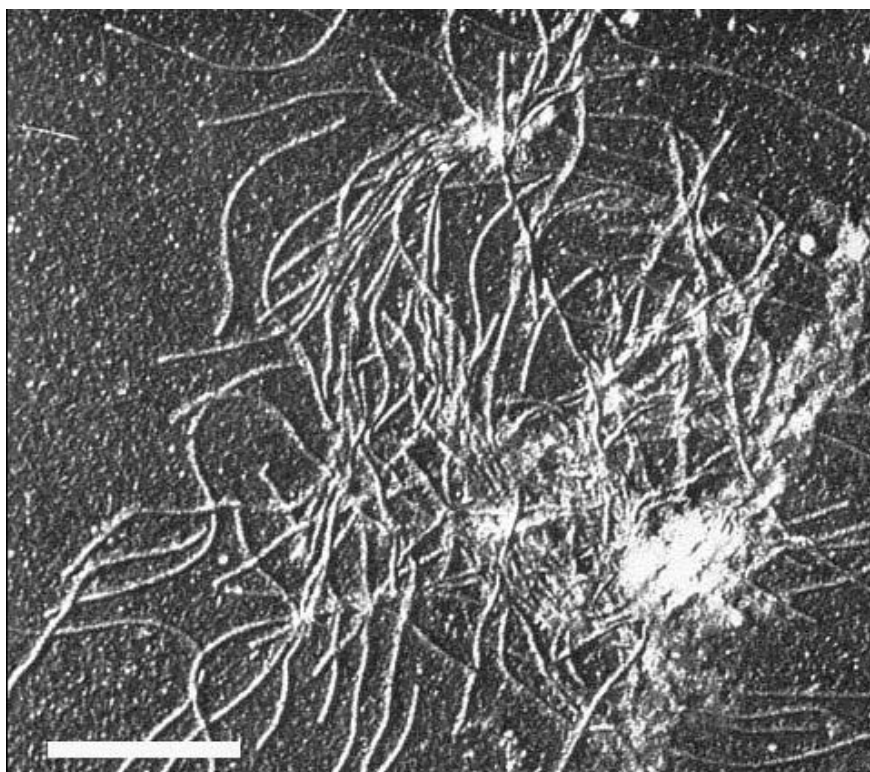
**Figura 1.6.** Representación esquemática del genoma del PPV (García *y col.*, 1994). ●- Extremo 5' VPg. Los productos proteicos codificados por cada región se indican debajo del genoma: **P1** primera proteína, **HC** proteína del factor asistente, **P3** tercera proteína, **6K<sub>1</sub>** primer péptido 6K, **CI** proteína de inclusión celular, **6K<sub>2</sub>** segundo péptido 6K, **NIa** proteína de inclusión nuclear "a", **NIb** proteína de inclusión nuclear "b", **CP** proteína de la cápsida.

Su ácido nucleico está compuesto por unos 9.800 nucleótidos con un peso molecular relativo de 3.200 daltons. Lain *y col.* (1989), Maiss *y col.* (1989) y Theychenev *y col.* (1989) determinaron la secuencia completa de diferentes aislados de este virus, localizando 9.786 nucleótidos, excluyendo la secuencia 3' terminal de poli(A).

El ácido nucleico está envuelto en una cápsida con un peso molecular relativo de 36.500 daltons, compuesta de muchas subunidades de una proteína de 330 aminoácidos. Es una de las cápsidas de proteínas más grandes dentro del género de los potyvirus (Ravelonandro *y col.*, 1988). En la Figura 1.7 podemos observar partículas virales de *Plum pox virus* fotografiadas al microscopio electrónico de transmisión.

El virus de la sharka se caracteriza por su gran variabilidad (Candresse, 1994). Los trabajos del INRA de Burdeos pusieron de manifiesto la existencia de dos grandes grupos de aislados: Tipo Dideron (D) y Tipo Marcus (M) (Marenaud *y col.*, 1975; Kerlan y Dunez, 1979; Marenaud, 1979).





**Figura 1.7.** Partículas virales del PPV purificadas y teñidas con platino/iridio. La barra representa 500 nm ([www.dpvweb.net/dpv/showfig.php?dpvno=70&figno=04](http://www.dpvweb.net/dpv/showfig.php?dpvno=70&figno=04)).

Posteriormente, la aparición en Egipto de un nuevo aislado denominado El Amar (Wetzel *y col.*, 1992b) originó discrepancias entre diferentes autores, que lo consideraban dentro del Tipo M (Krczal y Avenarius, 1994; Fuchs *y col.*, 1995) o como un tipo diferente (Tipo E) (García *y col.*, 1994; Candresse *y col.*, 1994). También fue descubierto un nuevo aislado sobre cerezo en Moldavia (Kalashyan *y col.*, 1994) que fue secuenciado (Nemchinov *y col.*, 1996), caracterizado y clasificado dentro de un nuevo Tipo, Cherry o Tipo C (Nemchinov y Hadidi, 1996). Más recientemente, James y Varga (2004) han detectado y caracterizado lo que parece un aislado diferente a todos los tipos (D, M, E, C) encontrados hasta la fecha. Su nombre es W3174 y fue detectado en Ontario (Canadá).

Los principales tipos de aislados presentan las siguientes características:

- Tipo Dideron (D): Está presente en casi todas las zonas afectadas por la sharka, exceptuando algunos países del este de Europa. Afecta al albaricoquero y ciruelo principalmente y en menor medida al melocotonero. Muestra una menor agresividad y velocidad de difusión que el Tipo M.

- Tipo Marcus (M): Hasta el momento, este tipo de aislados se ha detectado en países del este de Europa, Grecia, Francia, Italia y Alemania. Presenta una gran agresividad y una difusión en campo muy rápida (Quiot *y col.*, 1995). Afecta tanto al melocotonero como al ciruelo y al albaricoquero. En nuestro país fue detectado sobre la variedad de melocotonero 'Royal Glem' en Aragón, pero tras ponerse en marcha un programa para erradicar el foco, parece haber sido erradicado (Cambra *y col.*, 2004a).

- Tipo El Amar (E): En estos momentos se encuentra localizado únicamente en el norte de África. Presenta una gran agresividad, afectando al melocotonero, ciruelo y albaricoquero.

- Tipo Cherry (C): Se localiza en zonas de Centro Europa. Es el único que afecta al cerezo y además afecta al melocotonero, ciruelo y albaricoquero. Si bien inicialmente este tipo fue descrito en cerezo ácido (Kalashyman *y col.*, 1994), también ha sido descrito en Italia un aislado del virus sobre cerezo dulce que podría pertenecer a este tipo (Crescenzi *y col.*, 1997).

Actualmente, diversos trabajos se centran en nuevas estrategias moleculares para identificar y clasificar diferentes aislados, en general localizados en distintas regiones. Así, recientemente se han detectado aislados Tipo M en Alemania (Jaraus *y col.*, 2004), nuevos aislados Tipo M en la regiones de Lombardia y Veneto en Italia (Bianco *y col.*, 2004), Tipo M y Tipo D en Turquía (Caglayan *y col.*, 2004), Tipo D en Túnez (Boulila *y col.*, 2004) y tres aislados diferentes del Tipo D en Estados Unidos (Gildow *y col.*, 2004).

### **1.2.3. Origen y situación actual de la virosis en España**

En España, la sharka fue detectada por primera vez de forma simultánea en Sevilla, Murcia y Valencia en 1984, en albaricoquero, ciruelo y melocotonero (Llácer *y col.*, 1985). En la actualidad se encuentra localizada en la mayoría de las zonas productoras de *Prunus* del litoral mediterráneo. El aislado más extendido es el denominado Red Beaut (Llácer *y col.*, 1985), por detectarse en un primer momento en ciruelos japoneses 'Red Beaut'. Este aislado pertenece al Tipo D. Como ya hemos comentado anteriormente, hasta el momento sólo se han detectado aislados del Tipo M en Aragón, que han sido erradicados evitando su dispersión a otras zonas de producción, gracias a la rápida intervención de los servicios de sanidad vegetal de gobierno aragonés (Gorris *y col.*, 2003; Cambra *y col.*, 2004a).

Las Comunidades Autónomas de Murcia y Valencia han sido las más afectadas. Desde 1988 en Murcia y desde 1991 en Valencia los gobiernos autonómicos han desarrollado una política de arranque indemnizado de los árboles enfermos. En la Comunidad de Murcia, hasta finales de los años 90, se arrancaron más de 17.000 albaricoqueros y 100.000 ciruelos con un coste de un millón de Euros en indemnizaciones. En la Comunidad Valenciana han sido arrancados 351.000 albaricoqueros y 322.000 ciruelos con un coste superior a los 6 millones de euros (Dicenta *y col.*, 1998). Los datos de que disponemos del periodo 2001-2003 respecto a la Región de Murcia arrojan un balance de 8.200 albaricoqueros y 18.873 ciruelos arrancados, con un importe en indemnizaciones de 291.235 euros. Con respecto al melocotonero, aunque los gobiernos contemplan la indemnización por el arranque, el número de árboles arrancados ha sido prácticamente nulo.

### **1.2.3. Detección y localización del virus**

La disposición de métodos fiables de detección, localización y caracterización del virus es de una gran importancia en la evaluación de la resistencia a la sharka. Ello permite, por un lado, la determinación precisa del nivel de susceptibilidad de los materiales inoculados experimentalmente, y por otro la

identificación de los aislados con los que estamos trabajando. Han sido desarrollados diferentes métodos para la detección y localización del virus.

**Observación visual de síntomas y utilización de indicadores biológicos:** La observación visual de síntomas es el método más económico pero el menos fiable, debido a la posible confusión con síntomas producidos por otras causas. Por ello, y por los diversos factores que influyen en la exteriorización de la enfermedad, las observaciones deben ser realizadas por un experto.

La observación de síntomas de sharka en albaricoquero se realiza sobre las hojas en primavera y sobre los frutos maduros. Mediante este método existen graves riesgos de no detectar la enfermedad aunque esté presente, debido principalmente a la distribución errática del virus en el árbol (Albrechtova, 1986; Desvignes, 1988; Audergon *y col.*, 1989; Martínez-Gómez y Dicenta, 2001), a la baja concentración observada en los *Prunus* (Albrechtova, 1990) y a la influencia de las altas temperaturas sobre la desaparición de los síntomas (Hubert *y col.*, 1988). Además, después de la entrada del virus en la planta suele tener un periodo de incubación de hasta un año (Németh, 1986), durante el cual los árboles enfermos no muestran síntomas y pueden ser considerados sanos (Breniaux *y col.*, 1990; Candresse *y col.*, 1993). En melocotonero también se han descrito síntomas muy característicos en pétalos, siendo un método eficaz de detección (Desvignes y Bois, 1995).

Por otro lado, el indicador biológico tradicionalmente utilizado en el caso de la sharka es el melocotonero 'GF305' (Bernhard *y col.*, 1969), muy susceptible al virus y que suele manifestar síntomas tras dos o tres semanas de la inoculación (Desvignes, 1976; Breniaux *y col.*, 1990; Materazzi *y col.*, 1991). También han sido utilizados otros indicadores leñosos como algunas variedades de albaricoquero muy susceptibles (Hamdorf, 1982). En otros ensayos se han utilizado como indicadores plantas herbáceas, más rápidas de obtener y de inocular. Cabe destacar el quenopodio *Chenopodium foetidum*, y los tabacos *Nicotiana clevelandii* y *Nicotiana benthamiana* (Dosba *y col.*, 1988a).

La especie *Prunus tomentosa* también ha sido descrita como un buen indicador del PPV y de otros virus de frutales, con un cultivo en invernadero más

sencillo y una manifestación de síntomas más clara que el 'GF305' (Damsteegt *y col.*, 1997). Además esta especie permite la diferenciación de los Tipos D y M (Rankovic, 1980; Damsteegt *y col.*, 1997).

**ELISA:** Clark y Adams (1977) mostraron la efectividad de la prueba ELISA (Enzyme Linked Inmuno Sorbent Assay) (basada en la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo) en la detección de virus, utilizando anticuerpos específicos que reaccionaban con la proteína de su cápsida. Esta técnica ha sido aplicada a la detección de la mayoría de virus tanto en animales como en vegetales. Adams (1978) publicó el primer trabajo sobre detección de PPV en *Prunus* mediante esta técnica. Pracros *y col.* (1981) la describen como más sensible que la utilización del indicador biológico 'GF305' y más fácil para su aplicación en rutina.

Respecto a los diferentes tipos de pruebas ELISA, aunque al principio comenzó utilizándose la variante de doble anticuerpo (ELISA-DAS) (Adams, 1978), en la actualidad parece más ventajoso el sistema indirecto (ELISA-DASI) (Lommel *y col.*, 1982), que es el más utilizado para la detección de sharka en frutales (Albrechtova, 1990). Una detallada explicación del método en albaricoquero y melocotonero la podemos encontrar en los trabajos de Cambra *y col.* (1981) y Sánchez-Vizcaíno y Cambra (1981).

Al igual que en el resto de virus, en el caso del PPV la técnica fue aplicada primero utilizando anticuerpos policlonales (Adams, 1978; Cambra *y col.*, 1981) y luego monoclonales (Cambra *y col.* 1988; 1994a; López-Moya *y col.* 1994b). El empleo de anticuerpos monoclonales aumenta considerablemente la especificidad de la reacción (Himmler *y col.*, 1987; Pasquini y Barba, 1988) y mejora sensiblemente el análisis (Cambra *y col.*, 1994a; Pasquini *y col.*, 1995a).

La sensibilidad alcanzada por esta técnica oscila en torno a los 20-30 ng/ml de virus purificado (Malinowski y Zawadzka, 1992). Con el empleo de anticuerpos monoclonales se aumenta considerablemente la sensibilidad, llegando a detectar hasta 2 ng/ml de virus purificado (Navrátil *y col.*, 1992).

Debido a la distribución errática de este *Potyvirus* y la baja concentración viral típica en los *Prunus* (Marenaud y Yürektürk, 1974; Albrechtova, 1986; Audergon *y col.*, 1989; Töbiás *y col.*, 1992), en la toma de muestras para el ELISA, es más efectivo seleccionar hojas jóvenes de árboles en pleno crecimiento (Dosba *y col.*, 1986; Albrechtova, 1990) para evitar tomar muestras sanas (ELISA negativo) de árboles enfermos.

**Hibridación molecular:** La sensibilidad de la prueba ELISA puede ser superada utilizando la hibridación molecular (Varveri *y col.*, 1988b). Este método se basa en la fuerte unión que se produce entre dos cadenas simples de ácidos nucleicos para formar una doble hélice, cuando su secuencia nucleotídica es complementaria. Habitualmente en estas hibridaciones se utilizan sondas marcadas radioactivamente, que precisa instalaciones no accesibles a muchos laboratorios de diagnóstico (Nikolaeva, 1995).

La técnica más extendida hoy en día en detección es la llamada hibridación "Dot Blot". Esta técnica se basa en la desnaturalización del ácido nucleico del virus y su hibridación con una sonda marcada radioactivamente (fósforo radioactivo) (Varveri *y col.*, 1986; 1988a; Hull y Al-Hakim, 1988) en una membrana de nylon. Otras metodologías utilizan un marcador no radioactivo, biotina o digoxigenina (Pallás *y col.*, 1997), con una reacción colorimétrica o quimioluminiscente para el revelado de la membrana (Más *y col.*, 1993). Esta técnica también se ha utilizado en el mapeo del genoma de PPV (Wetzel *y col.*, 1992b) y en la caracterización de diferentes serotipos en otros virus como el *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV) (Crosslin *y col.*, 1992).

En el caso de la sharka, los primeros ensayos de detección mediante hibridación molecular comenzaron a finales de los años ochenta (Varveri *y col.*, 1986; 1987) con marcadores radioactivos, obteniendo una sensibilidad de hasta 500 pg/ml de virus (Varveri *y col.*, 1987; Wetzel *y col.*, 1990). Posteriormente se extendió la utilización de procedimientos no radioactivos con digoxigenina (Nemchinov y Hadidi, 1996; Herranz *y col.*, 2005).

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** Una de las técnicas más utilizadas actualmente en la detección de virus es la PCR. Esta técnica, basada en la amplificación de un fragmento específico del genoma del virus, surgió a mediados de los años ochenta (Saiki *y col.*, 1985) y supuso una revolución en el manejo de ácidos nucleicos. El detallado conocimiento de la secuencia del ácido nucleico de los virus de plantas ha sido uno de los elementos que han contribuido al desarrollo de esta técnica en cuanto a la detección de virus (Hadidi *y col.*, 1995; Sánchez-Navarro *y col.*, 2005).

La PCR es la técnica de detección más sensible, aunque resulta más laboriosa que las de tipo serológico (Miller y Martin, 1988; Henson y French, 1993). Krczal y Avenarius (1994) y Rowhani *y col.* (1995) la describen como 1.000 veces más sensible que el ELISA. Presenta el gran inconveniente de su elevado coste y difícil aplicación a la rutina (Hadidi *y col.*, 1995).

Para la detección de PPV se utilizan una serie de "cebadores" (iniciadores) específicos que, en presencia de una ADN polimerasa, permiten la amplificación de una región determinada del ácido nucleico del virus. Dado que la ADN polimerasa funciona sobre moldes de ADN, en el caso de la sharka es necesario un paso previo que convierta el genoma del ARN del virus en ADN. Este paso lo realiza una reacción de transcripción inversa (RT) dando como resultado un ADN complementario (ADNc). Este ADNc es amplificado mediante la PCR y visualizado en un gel de agarosa mediante un colorante (bromuro de etidio) (Korschinec *y col.*, 1991; Wetzel *y col.*, 1991a; Levy y Hadidi, 1994). A la reacción completa se le denomina RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction).

Se ha desarrollado una variante de la técnica PCR para aumentar su sensibilidad, que combina los métodos serológicos con los moleculares y que se conoce con el nombre de Inmunocaptura-PCR (IC-PCR) (Wetzel *y col.*, 1992a; Bousalem *y col.*, 1994; Candresse *y col.*, 1994; Corvo *y col.*, 1995). Candresse *y col.* (1994) la describen como 2.000 veces más sensible que la técnica ELISA. Esta variante consiste en la captura previa del virus con inmunoglobulinas y la posterior amplificación del ácido nucleico mediante RT-PCR.

**Inmunoimpresión de la proteína de la cápsida e impresión de los ácidos nucleicos del virus:** Estas técnicas de detección del virus, son a su vez capaces de localizar el virus en los distintos tejidos de la planta. Así, la inmunoimpresión de proteínas de la cápsida consiste en hacer impresiones de material vegetal sobre membranas de nitrocelulosa, que posteriormente son sometidas a una reacción antígeno-anticuerpo. Tras su tratamiento pueden observarse reacciones coloreadas mediante lupa binocular o microscopio. Con esta técnica pueden detectarse concentraciones de virus de hasta 10 ng (Bode *y col.*, 1984). Podemos encontrar una amplia revisión de esta técnica en Reid *y col.* (1992). En la inmunoimpresión del virus de la sharka se han utilizado anticuerpos policlonales (Dicenta *y col.*, 1995) o monoclonales (Cambra *y col.*, 1994b).

Para la localización del ácido nucleico del virus se utilizan diversas técnicas basadas en las reacciones de hibridación molecular en membranas de nylon mediante sondas marcadas complementarias al ARN viral. Esta técnica es similar a la anterior, usándose para la localización del virus sondas marcadas radioactivamente (Tet-Fatt *y Yang-Sung*, 1992) o sondas marcadas con digoxigenina (Mas *y Pallás*, 1995; 1996).

#### **1.2.4. Epidemiología y control de la virosis**

En cuanto a la transmisión del virus, los únicos vectores naturales descritos hasta ahora son los pulgones. Al menos 27 especies de estos áfidos han sido citadas como potenciales transmisores del virus (Kegler *y Schade*, 1971; Kunze *y Krczal*, 1971; Llácer, 1989; Labonne *y Lauriaut*, 1991; Avinent *y col.*, 1993; 1994; Labonne *y col.*, 1994a). Las principales especies de pulgones transmisoras del PPV en nuestro país son *Aphis spiraecola*, *Aphis gossypii* *y Aphis fabae*, aunque también han sido descritas otras especies como vectores con una menor importancia como *Aphis craccivora*, *Aphis citricola*, *Branchycaudus cardui*, *Branchycaudus prunicola*, *Myzus persicae*, *Myzus varians* *y Hyalopterus pruni* (Avinent *y col.*, 1993 *y 1994*).

La transmisión por el vector es del tipo no persistente. Este modo de transmisión se caracteriza por un ciclo corto durante el cual el pulgón adquiere el



virus tras una picadura de prueba y ya puede transmitirlo sin necesidad de un periodo de latencia en su hemolinfa. Este tipo de propagación favorece la rápida expansión de la enfermedad (Llácer, 1989; Labonne y Lauriaut, 1991; Avinent *y col.*, 1993; Labonne *y col.*, 1994a) y hace que la lucha contra el vector no sea efectiva.

El análisis de la difusión espacial y temporal de la sharka en campo ha puesto de manifiesto que la difusión de la enfermedad de ciruelos japoneses a albaricoqueros y entre individuos de la misma especie es muy rápida (Gottwald *y col.*, 1995). Por otro lado, investigaciones llevadas a cabo en Murcia demuestran que la transmisión se realiza primero a los árboles vecinos al foco de infección (Dicenta *y col.*, 1999). Recientemente Cambra *y col.* (2004b), en un estudio realizado en huertos de ciruelo, han podido comprobar como de un 11% de árboles infectados inicialmente se ha llegado hasta el 95% tras 12 años de estudio. De manera similar en albaricoquero Martínez-Gómez *y col.* (2003a), tras 12 años de observación, comprobaron que la enfermedad se incrementaba desde el 3% hasta el 15% de árboles infectados, a pesar de que los árboles fueron arrancados tras detectarse su infección.

Además, la transmisión puede realizarse a largas distancias por el hombre mediante la multiplicación de material vegetal infectado, ya sean patrones o variedades (Llácer, 1989).

La transmisión del virus a las semillas de plantas infectadas ha sido descrita por algunos autores (Nemeth y Kölber, 1982). Sin embargo, la teoría más aceptada en la actualidad es que, a pesar de que se ha detectado el virus en el polen y en la testa de la semilla, el virus se pierde durante la germinación, impidiendo finalmente su propagación a la descendencia (Eynard *y col.*, 1991; Triolo *y col.*, 1993).

Respecto al control de la enfermedad, la sharka es la virosis de frutales más difícil de combatir ya que es la única que se transmite por pulgones (Llácer, 1995a). Los métodos de control se pueden dividir en dos tipos:

*a) Métodos sanitarios o preventivos.* Consisten básicamente en actuaciones sanitarias encaminadas a la eliminación de las fuentes de inóculo, como el

arranque de plantas enfermas y actuaciones preventivas como el uso de material sano certificado (Refatti *y col.*, 1988; Keck *y col.*, 1992; Polák *y col.*, 1992; Llácer, 1995b; Martínez-Gómez *y col.*, 2003a).

*b) Cultivo de plantas resistentes:* El cultivo de plantas resistentes es el método más efectivo para controlar la sharka, por lo que en Europa la obtención de variedades resistentes de calidad es un objetivo común en los programas de mejora del albaricoquero (Karayiannis *y col.*, 1994); Audergon *y col.*, 1994; Polák *y col.*, 1995a; Dicenta *y col.*, 1996; Martínez-Gómez, 1998; Egea *y col.*, 1999). Las nuevas técnicas para la obtención de plantas transgénicas resistentes al PPV están dando también resultados esperanzadores (Laimer *y col.*, 1992; Câmara *y col.*, 1992; 1994; 1995; Escalettes *y col.*, 1994; Ravelonandro y Dunez, 1995; Dosba, 1996; Scorza *y col.*, 2004).

### **1.3. SUSCEPTIBILIDAD VARIETAL, SINTOMATOLOGÍA Y FUENTES DE RESISTENCIA**

Los síntomas que produce la enfermedad en los frutales pueden variar dependiendo de la especie y variedad de que se trate (Pelet y Bovey, 1968), la temperatura, la edad del árbol o su estado vegetativo (Hubert *y col.*, 1988). Es bien conocido que con las altas temperaturas del verano los síntomas se atenúan e incluso llegan a desaparecer (Lansac *y col.*, 1982). En general los árboles afectados por la sharka con un crecimiento activo, presentan más síntomas en hoja y fruto que aquellos con menor vigor. Estando el vigor claramente influenciado por la edad del árbol, la variedad, el patrón y el cultivo. Los síntomas se aprecian mejor en las zonas jóvenes que en las más adultas y lignificadas. La susceptibilidad y sintomatología en las especies afectadas es diferente.

**Albaricoquero:** Sin lugar a dudas, entre los frutales afectados por la sharka, el albaricoquero es el más amenazado y el que está sufriendo los daños económicos más importantes. La totalidad de las variedades de albaricoquero tradicionalmente cultivadas en Europa que han sido ensayadas, se han mostrado susceptibles a la sharka (Dosba *y col.*, 1988b; 1988c; 1989; Syrgiannidis *y col.*,

1988; Karayiannis, 1989; Llácer, 1994; Martínez-Gómez y Dicenta, 1999; Martínez-Gómez *y col.*, 2000). Karayiannis (1995) indica como en ensayos realizados en áreas infectadas de sharka, la totalidad de las variedades europeas ensayadas se han mostrado susceptibles después del primer año, observando una gran susceptibilidad en las variedades españolas.

En las hojas los síntomas se presentan en forma de manchas y anillos cloróticos apreciables tanto en el haz como en el envés. En frutos se aprecian decoloraciones en forma de anillos y manchas, así como deformaciones y depresiones en la superficie del fruto, presentando la carne del mismo un aspecto gomoso. Frecuentemente, sobre los huesos es característica la presencia de anillos cloróticos en la superficie. Las manchas en los huesos no parecen depender de la variedad sino de la intensidad de síntomas en el fruto, apareciendo las manchas más intensas en los frutos más deformados. Este tipo de síntomas es característico de la presencia inequívoca de sharka. En esta especie los daños pueden llegar a hacer incomercializable el 100% de la producción (Figura 1.8).

Las variedades que suelen mostrar los síntomas más importantes son las tempranas ('Currot', 'Palabras', 'Mauricios'), haciéndose más evidentes los síntomas en aquellas variedades de albaricoque que presentan más coloración. Las variedades más tardías como las "de clase" ('Pepitos', 'Carrascal', 'Velázquez') pueden presentar huesos con manchas y frutos sin daños externos, sobre todo en árboles poco vigorosos y en condiciones climáticas adversas, que producen un lento crecimiento (Rodríguez *y col.*, 1995).

En lo referente a las fuentes de resistencia, las únicas variedades resistentes proceden de los Estados Unidos ('Stark Early Orange', 'Stella', 'Henderson', 'NJA2', 'Goldrich', 'Sunglo', 'Veecot') y de Canadá ('Harcot', 'Harlayne') (Karayiannis, 1989; Syrgiannidis *y col.*, 1988; Dosba *y col.*, 1989; Audergon *y col.*, 1994; Candresse *y col.*, 1993; Llácer, 1994; Martínez-Gómez *y col.*, 2000).



**Figura 1.8.** Síntomas de sharka en albaricoquero. A.- Clorosis nerviales en hoja. B.- Anillos cloróticos en hoja. C.- Deformaciones en frutos. D.- Anillos sobre huesos.

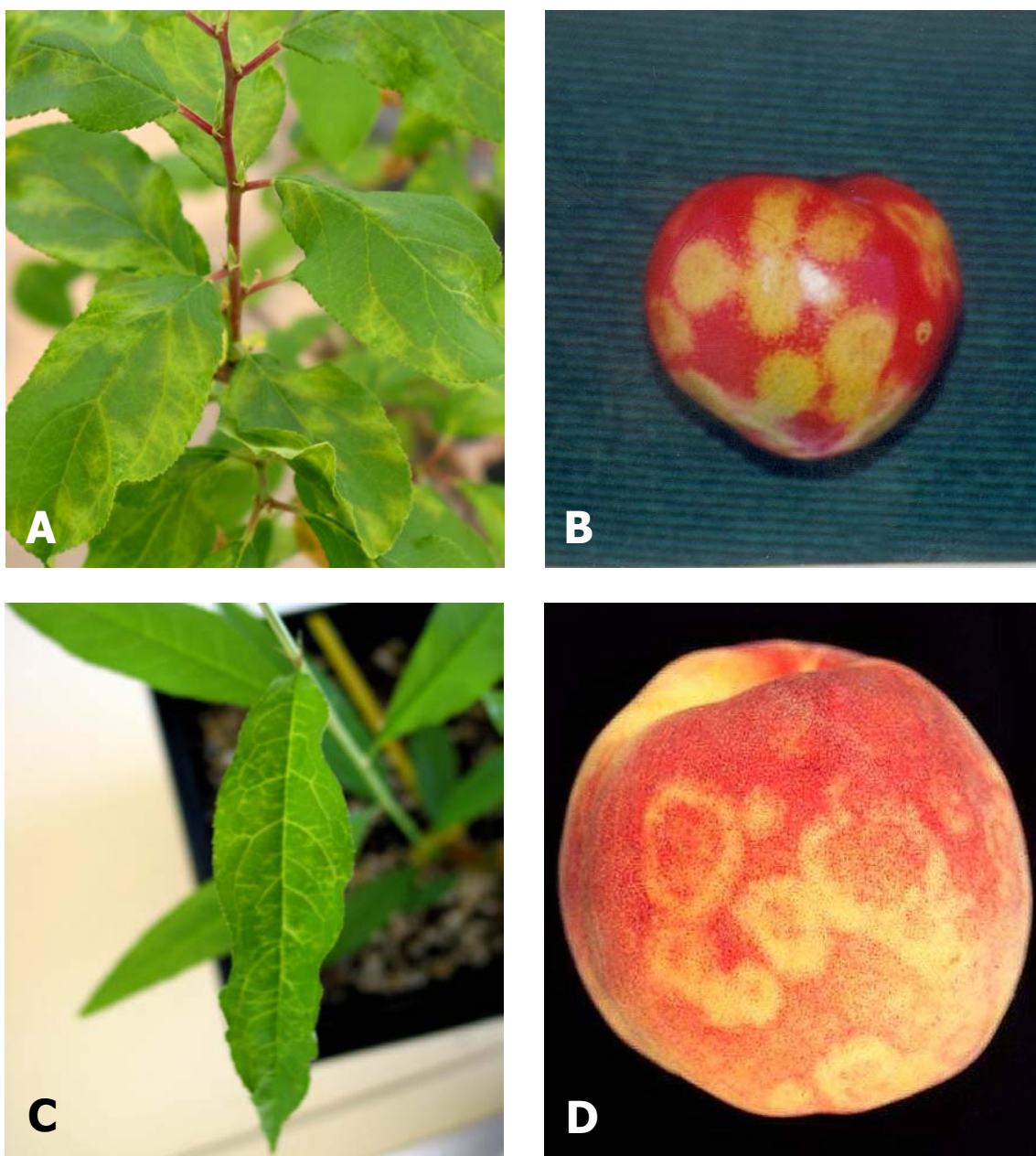
Desgraciadamente estas variedades resistentes presentan problemas de adaptación para su cultivo en nuestro país y carecen de interés comercial. Algunas variedades obtenidas en Grecia como 'Lito' y 'Pandora' y algunas selecciones francesas ('Avilara') también se han mostrado resistentes a la enfermedad. Las variedades norteamericanas 'Goldrich' y 'Harcot' no se consideran, actualmente, totalmente resistentes, ya que ha sido descrito algún caso de presencia de síntomas (Martínez-Gómez *y col.*, 2000).

Se ha demostrado que la resistencia de estas variedades puede ser transmitida a la descendencia en cruzamientos realizados con fines de mejora. Asimismo se ha determinado la naturaleza monogénica del carácter, siendo la resistencia dominante (Dicenta *y col.*, 2000). Fruto de la utilización de parentales resistentes en los diversos programas de mejora del albaricoquero ya hay disponibles algunas variedades resistentes como el caso de 'Seopa-1' y 'Golgi-2' del programa de mejora del IVIA de Valencia (Badenes *y col.*, 2003), además de las nuevas selecciones del CEBAS de Murcia estudiadas en esta Tesis.

**Ciruelo:** Al igual que en albaricoquero, la mayoría de las variedades cultivadas en Europa se han mostrado susceptibles a la enfermedad (Zawadzka *y col.*, 1994).

En hoja se presentan síntomas muy claros parecidos en algunos casos a los del albaricoquero con manchas y anillos cloróticos que, con posterioridad, pueden evolucionar a necrosis, en algunas variedades se pueden observar punteados cloróticos. En el fruto, los síntomas aparecen como decoloraciones en anillos y manchas, así como deformaciones y depresiones de su superficie, presentando la carne subyacente un aspecto acorchado (Figura 1.9). A diferencia del albaricoquero, en ciruelo no se han observado síntomas en hueso.

En la variedad 'Red Beaut' la sintomatología en hoja y frutos parece estar especialmente influida por las temperaturas, siendo muy difícil encontrar síntomas en años calurosos. Es frecuente encontrar árboles con muchos frutos dañados y otros con menos. En fruto se presentan manchas deprimidas con aspecto acorchado que posteriormente se necrosan. En hoja aparecen síntomas en forma de manchas cloróticas y anillos.



**Figura 1.9.** Síntomas de sharka en ciruelo y melocotonero. A.- Hojas de ciruelo con síntomas de la enfermedad. B.- Ciruela con fuertes manchas cloróticas de PPV. C.- Hojas de melocotonero con típicas clorosis nerviales. D.- Anillos cloróticos sobre piel de melocotón.

En la variedad de ciruelo japonés 'Santa Rosa' los síntomas en hoja son muy suaves y en fruto casi inapreciables. En 'Golden Japan' los síntomas en hoja son muy suaves (como en 'Santa Rosa') y en fruto muy pronunciados (como en 'Red Beaut').

Existe una gran variabilidad respecto a los tipos de resistencia a la sharka descritos en ciruelo (Hamdorf, 1987). Algunas variedades se han mostrado resistentes a aislados tipo Marcus como es el caso de 'Jalomicta' y 'Ersinger' (Dosba *y col.*, 1994b). Por otro lado, Minoiu (1994) encontró igualmente una gran variabilidad para la resistencia en esta especie citando nueve variedades posiblemente resistentes en las que no observó síntomas en frutos. También se han encontrado cuatro cultivares resistentes entre los ciruelos moldavos (Udlinionnaia, Opal, Jelta Bouttilkovidna y Kirke), además de 10 cultivares muy tolerantes y otros 9 híbridos también tolerantes (Lahmatova *y col.*, 1998).

Kegler *y col.* (1994), sugirieron una nueva forma de resistencia, pues encontraron que algunos ciruelos tenían una respuesta muy rápida a la enfermedad. A esta veloz respuesta la denominaron hipersensibilidad, mediante la cual la infección se extiende muy rápido en las zonas de infección, provocando la necrosis y muerte de estas zonas, por lo que la enfermedad no se extiende al resto de la planta. En ensayos con plantas de respuesta hipersensible, tras la infección, fueron las únicas que no presentaron el virus, comparadas con las susceptibles (Hartmann y Petruschke, 2000).

En Murcia, en las variedades de ciruelo europeo como 'Reina Claudia de Vavays' no se han observado síntomas, si bien hay que señalar que su cultivo en la Región de Murcia no está próximo a las zonas afectadas por la sharka.

**Melocotonero:** La mayoría de las variedades de melocotonero que han sido ensayadas se ha mostrado susceptibles a la sharka, especialmente a aislados Tipo M, presentando síntomas en hoja y un buen número de variedades también en frutos (Mainou y Syrgiannidis 1992; Dosba *y col.*, 1994a). Algunas variedades de melocotonero como el 'GF305' son especialmente sensibles a la sharka, por cuya razón es utilizado tradicionalmente como planta indicadora de la enfermedad.

La sintomatología se caracteriza por una menor coloración de las zonas que rodean los nervios principales de la hoja, así como algún punteado clorótico. En frutos aparecen manchas y anillos decolorados y zonas deprimidas pero sin necrosis (Figura 1.9), en el caso de aislados Tipo D y cultivares españoles (Rodríguez e Hita, 1995). En el caso de aislados Tipo M pueden encontrarse síntomas más graves, como la presencia en las hojas de puntos cloróticos, nervios necrosados y bordes ondulados. Sobre el fruto pueden aparecer malformaciones, manchas y anillos decolorados (Adamolle *y col.*, 1994).

Entre las variedades cultivadas en la Región de Murcia, se han observado síntomas en fruto pero no en hojas en 'Caterina', 'Babygold-6' y 'Vesubio'. En el caso de los "chatos" o "paraguayos", hasta la fecha no han sido observados síntomas ni en frutos ni en hojas a pesar de estar cultivados sobre "Pollizos" con fuertes síntomas de sharka.

Hasta la fecha no se han descrito fuentes de resistencia dentro de las variedades cultivadas de melocotonero (Gabova, 1994; Escalettes *y col.* 1998; Pascal *y col.*, 2002). Dentro de la susceptibilidad generalizada existente en melocotonero, es posible encontrar una variabilidad importante en cuanto al nivel de esta susceptibilidad, habiendo variedades más o menos susceptibles y algunas que no presentan síntomas en hojas ('Moon Grand' y 'Red Bird Cling') o en frutos ('Dupniska' y 'Superior Pacific Star') (Gabova, 1994). Escalettes *y col.* (1998) han encontrado un par de melocotoneros ornamentales con resistencia, el 'S2844' clon de 'Russel Red' originario del Reino Unido y el S2873 clon de 'Early Double Red' originario de Estados Unidos. La especie *Prunus davidiana*, puede ser de gran interés por su gran resistencia a aislados Tipo M y proximidad a la especie melocotonero (Pascal *y col.*, 2002).

**Almendro:** Los estudios llevados a cabo en esta especie son muy escasos si los comparamos con las especies anteriores. El almendro ha sido descrito tradicionalmente como una especie resistente o incluso inmune al PPV, al no encontrar plantas de almendro en condiciones naturales de campo infectadas por el virus (Giunchedi, 1986; Németh, 1986). Sin embargo, posteriormente Dallot *y col.* (1996) demostraron la posibilidad de inoculación artificial de plantas procedentes de la variedad de almendro 'Ai'.



La resistencia generalizada que presenta el almendro hace que cualquier variedad pueda ser utilizada como donante de resistencia en cruzamientos inter-específicos con especies próximas. En este sentido, Martínez-Gómez *y col.* (2004) indicaron la posibilidad de la utilización de esta especie como fuente de resistencia en melocotonero.

**Cerezo:** La mayoría de las variedades de cerezo son resistentes a los distintos aislados Marcus y Dideron, mostrándose susceptibles únicamente cuando se infectan con aislados Tipo C. Faniluglio *y col.* (2004) no encontraron ninguna variedad resistente a aislados tipo C. Los estudios sobre el nivel de resistencia/susceptibilidad realizados en cerezo son escasos, debido a la menor incidencia de la sharka en esta especie.

**Patrones de frutales de hueso:** Hasta el momento son muy escasos los estudios sobre el comportamiento frente al virus de la sharka de los patrones del género *Prunus* comúnmente utilizados. Estos estudios han puesto de manifiesto una gran variabilidad en el comportamiento de dichos patrones.

Los patrones más utilizados en el cultivo del albaricoquero son los francos de semilla de 'Real Fino' y 'Canino', los cuales se han mostrado muy susceptibles al virus. En cambio el híbrido 'GF677' (almendro×melocotonero) utilizado en almendro y melocotonero se ha mostrado resistente (Audergon *y col.*, 1995a).

Otros estudios, muestran la resistencia de algunos patrones como el melocotonero 'Montclar' y la susceptibilidad del ciruelo 'Mariana' y del melocotonero 'Rubira' (Audergon *y col.*, 1995b). Finalmente estos mismos autores clasifican como susceptibles a los híbridos interespecíficos 'Cadaman', 'Jaspi' e 'Isthara'.

**Plantas herbáceas:** Además de las especies del género *Prunus*, el *Plum pox virus* es capaz de infectar diversas especies herbáceas. Nemeth (1986) indicó 15 especies de hierbas y plantas ornamentales afectadas por este virus. Más recientemente, Viršček *y col.* (2004) encontraron que de 13 especies recolectadas en campo 10 presentaban el virus. La presencia del virus en estos huéspedes herbáceos puede jugar un papel importante en la dispersión de la enfermedad, al actuar como posible reservorio de pulgones.

#### **1.4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

El cultivo de frutales de hueso (*Prunus*) es de gran importancia en la cuenca mediterránea, siendo nuestro país uno de los principales productores mundiales. Por otro lado, la sharka (*Plum pox virus*, PPV) es uno de los problemas más graves en la producción de estos frutales en nuestro país y más concretamente en una de las principales zonas de producción como es la Región de Murcia. Esta enfermedad está ocasionando cuantiosas pérdidas económicas debido a los daños producidos en las plantaciones y a las indemnizaciones pagadas por la administración, por el arranque de los árboles enfermos.

Ante la falta de otras medidas definitivas de control (en la actualidad sólo se lleva a cabo el arranque de plantas enfermas y la replantación con plantas certificadas), el cultivo de variedades resistentes se presenta como la estrategia más efectiva. Estas variedades resistentes pueden proceder de otros países o de programas de mejora. La mejora genética para resistencia a la sharka en frutales es pues un objetivo prioritario en los distintos países que se ven afectados por la enfermedad.

Uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta en estos programas de mejora, es la disponibilidad de un método eficiente de la evaluación de la resistencia. También es imprescindible disponer de una información precisa sobre el comportamiento frente al virus (susceptibilidad/resistencia) de los diferentes materiales (variedades, líneas de mejora, especies silvestres, etc.) que puedan ser utilizados como genitores y sobre la posibilidad de transmitir la resistencia a las descendencias.

En el contexto de estos programas de mejora genética para resistencia a la sharka, los objetivos de la presente Tesis Doctoral son los siguientes:

1.- Optimizar el método de evaluación de la resistencia en condiciones controladas (técnicas de detección, localización del virus, movimiento del virus) y validar su fiabilidad en condiciones naturales en campo.

2- Evaluar el comportamiento frente a la sharka de diversas variedades cultivadas de *Prunus* con interés para la mejora (albaricoquero, ciruelo, melocotonero, nectarina y almendro) así como de patrones de frutales, líneas de mejora y especies silvestres.

3.- Profundizar en el conocimiento de la transmisión de la resistencia a la sharka en albaricoquero y en cruzamientos interespecíficos de almendro x melocotonero y de albaricoquero x *P. mandshurica*.

## **2. Material y métodos**



## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. MATERIAL VEGETAL

El material vegetal estudiado consistió, en diversas especies del género *Prunus*. Como plantas indicadoras se utilizaron la especie herbácea *Nicotiana benthamiana*, y los patrones francos de albaricoquero 'Real Fino' y de melocotonero 'GF305'. También se estudiaron diferentes variedades de frutales cultivadas y líneas de mejora de especies del género *Prunus*, además de patrones de frutales de diferentes especies del género *Prunus*, especies silvestres y descendientes de cruzamientos inter e intraespecíficos (Tabla 2.1).

**Tabla 2.1.** Clasificación botánica y uso agrícola de las especies del género *Prunus* estudiadas.

Súbgénero	Sección	Especie	Uso agrícola
<i>Prunus</i>	<i>Prunoceraus</i>	<i>P. armeniaca</i>	Variedades de albaricoquero cultivadas
		<i>P. mandshurica</i>	Especie silvestre próxima al albaricoquero cultivado
	<i>Prunus</i>	<i>P. domestica</i>	Variedades de ciruelo europeo cultivadas
		<i>P. salicina</i>	Variedades de ciruelo japonés cultivadas
		<i>P. insititia</i>	Ciruelo "Pollizo" utilizado como patrón
		<i>P. cerasifera</i>	Ciruelo utilizado como patrón
		<i>P. munsoniana</i>	Especie silvestre próxima al ciruelo cultivado
		<i>P. simonii</i>	Especie silvestre próxima al ciruelo cultivado
<i>Amygdalus</i>	<i>Euamygdalus</i>	<i>P. persica</i>	Variedades de melocotonero y nectarina cultivadas
		<i>P. davidiana</i>	Especie silvestre próxima al melocotonero cultivado
		<i>P. dulcis</i>	Variedades de almendro cultivadas
<i>Cerasus</i>	<i>Microcerasus</i>	<i>P. cerasus</i>	Variedades de cerezo ácido cultivadas
		<i>P. pumila</i>	Cerezo enano utilizado como patrón
		<i>P. beseeyi</i>	Especie silvestre próxima al cerezo cultivado
		<i>P. lannesiana</i>	Especie silvestre próxima al cerezo cultivado

### 2.1.1. Plantas indicadoras

***Nicotiana benthamiana*** (Domin.): Es una especie herbácea muy susceptible al *Plum pox virus* (PPV) que permite grandes concentraciones de virus en sus tejidos (Kamenova, 1990). Por esto y por su fácil manejo, es una planta indicadora de gran utilidad. Ha sido utilizada como planta de referencia en los ensayos relacionados con el PPV en numerosas ocasiones (Morvan y Chastelliere, 1980; Regner *y col.*, 1992; Ravelonandro *y col.*, 1994; Câmara *y col.*, 1994; Labonne *y col.*, 1994b; Martínez-Gómez *y col.*, 2000).

**Albaricoquero 'Real Fino'**: Es una variedad originaria de Murcia muy utilizada como patrón franco de albaricoquero en esta región. Después de 'Búlida' es la segunda variedad más importante destinada a la conserva. Las plantas utilizadas en nuestros ensayos proceden de semillas de 'Real Fino' obtenidas en la industria conservera. Este material ya ha sido utilizado en los ensayos de evaluación de la resistencia a PPV en albaricoquero (Martínez-Gómez y Dicenta, 1999).

**Melocotonero 'GF305'**: Patrón franco seleccionado en la estación experimental de la Grande Ferrade de Burdeos en los años setenta por su elevada susceptibilidad a gran número de virus de plantas leñosas, como es el caso del PPV (Bernhard *y col.*, 1969; Desvignes, 1976). Es utilizado frecuentemente como indicador biológico en los sistemas de cuarentena (Waterworth, 1994), y en la evaluación del nivel de resistencia de frutales como albaricoquero (Audergon y Morvan, 1990; Audergon *y col.*, 1995b) y melocotonero (Gavoba *y col.*, 1994). Como patrón comercial es muy poco utilizado y destaca por su gran vigor y la rápida entrada en producción de la variedad (Lichou y Audubert, 1992). Las plantas empleadas, proceden de semillas de polinización libre de árboles localizados en la Finca Experimental Tres Caminos del CEBAS, situada en la localidad de Santomera (Murcia).

## 2.1.2. Variedades de frutales del género *Prunus*

### 2.1.2.1. Albaricoqueros

**Búlida:** Variedad autocompatible originaria de Murcia y fundamentalmente cultivada en esta región. Esta variedad ocupa el 80% de la superficie regional dedicada al albaricoquero, siendo la variedad más importante a nivel nacional. Su destino es en gran parte para conserva, aunque en zonas con recolección precoz se destina al mercado en fresco. Posee un fruto de tamaño medio (Egea *y col.*, 1994) y es susceptible al PPV (Martínez-Gómez *y col.*, 2000).

**Canino:** Variedad española de origen valenciano autocompatible, principalmente cultivada en la Comunidad Valenciana (Egea *y col.*, 1994; Badenes *y col.*, 1997). De maduración media-tardía, muy productiva ya desde los primeros años, con vigor medio y buena calidad del fruto (Della Strada *y col.*, 1989). Es una de las variedades de albaricoquero que posee una mayor plasticidad en cuanto a su adaptación a diferentes zonas (Pérez-González, 1992), siendo utilizada en ensayos en diferentes centros de investigación en todo el mundo. Presenta también una gran susceptibilidad frente al PPV (Martínez-Gómez *y col.*, 2000).

**Dorada:** Nueva obtención del CEBAS-CSIC de Murcia, procedente del cruzamiento 'Bergeron' x 'Moniquí'. El árbol es de vigor medio, maduración relativamente tardía, productividad muy elevada y un fruto de color amarillo-naranja grande y de gran calidad gustativa. Tiene muy buena aptitud industrial por lo que dado lo tardío de su floración, sería la variedad idónea para sustituir a 'Búlida' en las áreas con más riesgo de helada en las que éste se cultiva (Egea *y col.*, 2005b).

**Goldrich:** Variedad de origen estadounidense, obtenida por la Universidad de Washington del cruzamiento 'Sunglo' x 'Perfection'. Es autoincompatible y muy productiva (Audergon *y col.*, 1991; Burgos *y col.*, 1997). Su fruto, grande y bueno cuando está maduro, tiene cierta acidez y un color anaranjado (Crociani *y col.*, 1995). Hace algunos años se puso de manifiesto su susceptibilidad frente a algunos aislados de PPV (Polák *y col.*, 1995a).



**Harcot:** Variedad de origen canadiense (Ontario), procedente del cruzamiento {'Geneva' x 'Naramata'} x 'Morden 604' x ('Phelps' x 'Perfection'). Es autoincompatible (Burgos *y col.*, 1997) con un fruto de color rojo oscuro muy atractivo, y un sabor algo diferente al de los albaricoqueros tradicionales (Della Strada *y col.*, 1989; Crociani *y col.*, 1995). Al igual que en el caso de la variedad 'Goldrich', se ha comprobado que su resistencia puede ser vulnerada después de seis años en condiciones de infección natural (Karayiannis, 1989; Audergon *y col.*, 1995b).

**Harlayne:** Variedad de origen canadiense (Ontario) del cruzamiento de 'V51095' x 'Sunglo', de fruto anaranjado con zonas rojizas de tamaño medio y con altas necesidades de frío (Della Strada *y col.*, 1989). Variedad considerada resistente al PPV por diferentes autores (Karayiannis, 1995; Karayiannis *y col.*, 1999).

**Henderson:** Variedad de origen estadounidense de parentales desconocidos, de fruto mediano con la piel muy brillante (Della Strada *y col.*, 1989). Variedad también considerada como resistente al PPV (Karayiannis *y col.*, 1999).

**Lito:** Variedad de origen griego obtenida del cruzamiento 'Stark Early Orange' x 'Precoz de Tirinto' (Syrgiannidis y Mainou, 1991). Presenta una baja inducción floral y maduración tardía. Posee un fruto de aspecto atractivo con un tamaño medio, de considerable dureza y con poco sabor (Egea, comunicación personal).

**Murciana:** Nueva obtención del CEBAS-CSIC de Murcia, procedente del cruzamiento 'Orange Red' x 'Currot'. Presenta necesidades de frío algo superiores a 'Búlida' floreciendo después que esta variedad, es de gran aptitud industrial y entra muy rápidamente en producción, teniendo un gran vigor. El fruto es de tamaño medio con chapa roja apreciable, carne naranja y resistente al rajado. Es otra variedad ideal para sustituir a 'Búlida', pues además de su buena aptitud industrial presenta una mejor calidad gustativa, siendo por tanto una variedad de doble aptitud (Egea *y col.*, 2005a).

**NJA2:** Variedad estadounidense obtenida en la Universidad de New Jersey a principios de los años 70. Se caracteriza por la buena calidad del fruto y es utilizada habitualmente como parental en los programas de mejora genética de esta universidad (Goffreda *y col.*, 1995). Es resistente al PPV (Karayiannis y Mainou, 1994). Otra característica a destacar de esta variedad es su menor requerimiento en frío comparado con el resto de las variedades resistentes.

**Pandora:** Al igual que 'Lito', procede del cruzamiento 'Stark Early Orange' x 'Precoz de Tirinto'. Es un árbol de elevado vigor, productivo y de floración temprana. Su fruto es esférico, de tamaño medio y sabor dulce, resistiendo poco la manipulación (Syrgiannidis y Mainou, 1991). Es resistente al PPV (Martínez-Gómez y Dicenta, 2000).

**Rojo Pasión:** Reciente obtención del CEBAS-CSIC de Murcia, descendiente del cruzamiento 'Orange Red' x 'Currot'. Esta variedad tiene menos necesidades de frío que 'Búlida' y similares a 'Mauricio', poseyendo una época de maduración similar a esta última. Su fruto presenta chapa roja y un tamaño medio aceptable para su época de maduración (55-60g). Es de carne naranja suave y de buena calidad gustativa. La productividad es muy elevada (Egea *y col.*, 2004a).

**Real Fino:** Variedad originaria de Murcia, muy cultivada en la localidad de Pliego. Después de Búlida es la segunda variedad más importante empleada para la conserva. El árbol es poco vigoroso. Es una variedad autocompatible, de maduración tardía y con un fruto de gran tamaño (Egea, 1998). Es susceptible a sharka.

**Selene:** Reciente obtención del CEBAS-CSIC de Murcia, descendiente de 'Goldrich' x 'A2564'. Tiene unas necesidades de frío similares a 'Búlida' y una época de maduración ligeramente más tardía que éste. Posee un fruto brillante, de color naranja intenso con escasa chapa roja y carne naranja brillante. Su productividad es enorme y la fruta tiene un buen comportamiento frente a la manipulación y la conservación (Egea *y col.*, 2004b).

**Stark Early Orange:** Variedad estadounidense de origen desconocido seleccionada a principios de siglo. Es de floración tardía, autoincompatible (Burgos *y col.*, 1997), poco productiva y de fruto pequeño muy ácido (Della Strada *y col.*,

1989). Debido a sus características, muy diferentes al resto de variedades de albaricoquero y después de un análisis de isoenzimas, Badenes *y col.* (1996) apuntaron la posibilidad de que fuera un híbrido interespecífico entre *P. armeniaca* y *P. mandshurica*. Fue una de las primeras variedades descritas como resistentes al PPV (Syrgiannidis, 1980).

**Stella:** Variedad estadounidense de origen desconocido seleccionada a principios de siglo. Es de floración tardía, autoincompatible (Burgos *y col.*, 1997), poco productiva y con fruto pequeño, ácido y de poca calidad (Della Strada *y col.*, 1989). Al igual que 'Stark Early Orange' fue una de las primeras variedades de albaricoquero descritas como resistentes al PPV (Syrgiannidis, 1980), y es considerada como una buena fuente de resistencia en los programas de mejora (Audergon *y col.*, 1995c; Dicenta y Audergon, 1998).

**Sunglo:** Variedad de origen estadounidense seleccionada en los años sesenta en el estado de Minnesota. Es una variedad muy vigorosa, con elevadas necesidades de frío, que posee un fruto de buen tamaño y una gran firmeza (Layne y Gadsby, 1995).

**Veecot:** Variedad de origen canadiense obtenida de la polinización libre de 'Reliable'. Variedad con frutos de tamaño medio, de forma oblonga, con la piel algo brillante y un sabor poco dulce (Della Strada *y col.*, 1989). Este cultivar también es considerado como resistente (Karayiannis, 1995).

#### *2.1.2.2. Ciruelos*

**Angeleno:** Variedad de ciruelo japonés, originaria de Fresno (California, EE.UU). Tiene los frutos de tamaño medio a grande, de color negro, con la pulpa amarilla, consistente y con ligera acidez. El árbol es de vigor elevado con el porte globoso y muy productivo.

**Blackamber:** De origen californiano, este ciruelo japonés presenta frutos de un calibre de medio a grande, de color casi negro, con la pulpa firme y de buen sabor. Los árboles son de vigor medio y muy precoces.

**Friar:** Ciruelo japonés de origen californiano. Tiene los frutos de color negro, con la pulpa de color ámbar y buen calibre. El árbol presenta un gran vigor y muy buena productividad.

**J300:** Híbrido de ciruelo (*P. salicina* x *P. cerasifera*). Posee un gran vigor como patrón de ciruelo, presentando un grave problema de susceptibilidad a fitoplasmas.

**Ozark Premier:** Ciruela japonesa de fruto grande, piel púrpura rojiza y pulpa amarilla. Los árboles poseen vigor medio y porte abierto.

**Obilnaya:** Híbrido interespecífico descendiente de 'Burbano' (*P. salicina*) x 'Tavriceskaja' (*P. cerasifera*) originario de la Unión Soviética (Rusia), conservado en el jardín botánico de Yalta.

**President:** Ciruela del tipo europeo, originaria del Reino Unido, de maduración tardía. Tiene un fruto grande, de color azul oscuro con el hueso libre y la pulpa de un atractivo color naranja. Precisa polinización cruzada al ser autoincompatible.

**Questch:** Es una antigua variedad de ciruelo europeo, no muy cultivada y con un fruto de escasa calidad, que se utiliza para la obtención de un licor tras su destilación.

**Red Beaut:** Variedad de ciruelo japonés de origen norteamericano, de frutos gruesos, redondos y de color rojo vinoso. Presenta una pulpa amarilla, azucarada, muy jugosa y con buen sabor. Es la variedad más temprana de las cultivadas en España.

**Golden Japan:** Variedad de ciruelo japonés originaria de Estados Unidos procedente de un complejo cruce interespecífico [(*P. simonii* x *P. salicina*) x (*P. cerasifera* x *P. munsoniana*)]. Posee un fruto de tamaño grande, de piel gruesa y resistente, de color amarillo dorado, con la pulpa también amarilla y jugosa. Su maduración es de temporada media y su productividad buena.

**Santa Rosa:** Variedad de ciruelo japonés de origen norteamericano obtenida a principios de siglo. Ocupa el primer lugar de las exportaciones

españolas. Esta variedad posee un fruto grande, redondo y acorazonado, con la piel de color rojo intenso y la pulpa amarillo rojiza y muy aromática.

### 2.1.2.3. Melocotoneros y nectarinas

**Andross:** Selección californiana de melocotonero de gran calidad tanto para consumo en fresco como para procesado, ya que resiste muy bien la manipulación. Es un árbol muy vigoroso y productivo con frutos de epidermis amarilla muy vistosa y chapa roja. En zonas húmedas puede tener problemas de podredumbre.

**BabyGold:** Variedad de melocotonero de origen norteamericano obtenida en New Jersey a principios de los años 60 (Hough *y col.*, 1962), introducida en España en los años ochenta y muy extendida en la actualidad. Se caracteriza por su elevada producción y frutos de carne amarilla y de gran tamaño (USDA, 1998).

**Bigtop:** Nectarina de origen californiano, con frutos de color rojo intenso, redondeados, de gran calibre, con la pulpa amarilla y hueso adherido. El árbol es muy productivo y vigoroso.

**Bolinha:** Selección brasileña de melocotonero para procesado. El mayor interés de esta variedad radica en su utilización en programas de mejora por su resistencia a *Monilia fruticola*.

**Calabacero:** Variedad autóctona de la Región de Murcia de gran calidad organoléptica. Su fruto es de tamaño medio, de carne dura y color muy intenso, con buena aptitud para el procesado (Egea *y col.*, 1988a).

**Caterina:** Variedad de origen norteamericano obtenida en New Jersey a principios de los años 70 y muy cultivada en nuestro país. Posee un fruto de carne amarillo-anaranjada y gran firmeza. Se caracteriza por su elevada producción (USDA, 1998).

**Chatos:** Variedad población de melocotonero con los frutos muy aplanados (platicarpa). Suele ser muy productivo, destacando su gran calidad gustativa, pues en general son de coloración muy escasa.

**Dr Davis:** Variedad de melocotonero obtenida en la Universidad de California-Davis, en 1982. El árbol es vigoroso, con una productividad muy elevada, con frutos firmes, de color amarillo, globosos, con la pulpa dorada y el hueso adherido. Principalmente se usa para procesado.

**Flordastar:** Variedad de melocotonero obtenida en la Universidad de Florida. Posee bajas necesidades de frío. El árbol es vigoroso y de productividad media. El fruto es de color rojizo y pulpa amarilla.

**Halford:** Variedad de melocotonero Norteamericana, de productividad media, procedente de un descendiente de la variedad 'Lovell'. La calidad del fruto es buena, presentando coloración verdosa junto al hueso. Se usa principalmente para procesado.

**Loadel:** Selección Norteamericana de melocotonero procedente de la variedad 'Lovell'. Variedad muy vigorosa y productiva, de color amarillo intenso, calidad gustativa media y con coloración verdosa junto al hueso. Se destina principalmente para procesado.

**Marujas:** Variedad población de melocotonero autóctona de la Región de Murcia, de vigor medio con fruta de muy buena calidad y aptitud para la conserva, aunque su productividad es escasa (Egea *y col.*, 1988a).

**Ross:** Melocotonero obtenido en la Universidad de California-Davis. El árbol es de porte semierguido, vigor medio pero productivo. Posee una fruta firme, grande y globosa de color amarillo intenso, de pulpa consistente y hueso adherido. Su uso principal es el procesado.

**Rubidoux:** Selección Californiana de melocotonero para consumo en fresco. En España sólo posee algo de interés por su época de maduración tardía (Septiembre). Sus frutos tienen buen calibre, pero escasa coloración y pulpa poco consistente, de calidad regular.

**Silvery:** Variedad de nectarina californiana, de carne blanca y fruto de calidad intermedia.

**Snow Queen:** Nectarina de vigor medio y elevada productividad. El fruto es de muy buena calidad y de pulpa blanca muy consistente. Se ve afectada por el agrietado o aunque se compensa por su gran productividad.

**Sudanell:** Variedad de melocotonero de origen español muy cultivada en todo el país desde principios de los años ochenta. Es de maduración tardía, de carne amarilla muy dura, frutos de buen tamaño y muy buena calidad gustativa (Cambra, 1979).

**Springcrest:** Variedad de melocotonero de origen californiano, de vigor medio. Frutos de carne amarilla, calibre de medio a pequeño y el hueso semi-adherido. Su maduración es temprana.

**Zincal-5 (Sunred):** Variedad de nectarina con la piel y la pulpa de color rojo, pulpa firme de sabor muy dulce y hueso semi-libre. Presenta un crecimiento muy vigoroso, siendo su maduración temprana.

**54P455:** Selección de melocotonero de carne blanda para el mercado en fresco norteamericano, obtenida recientemente en la Universidad de California-Davis.

***Prunus davidiana:*** Especie silvestre afín al melocotonero cultivado (Hesse, 1975). Utilizada ampliamente en la mejora genética del melocotonero sobre todo como fuente de resistencia a enfermedades (Hesse, 1975; Kervella *y col.*, 1994; Pérez-González, 1997). Ha sido descrita como resistente a la sharka por diversos autores y como posible fuente de resistencia en melocotonero (Kervella *y col.*, 1994; Dunez, 1997; Escalettes *y col.*, 1998).

#### 2.1.2.4. Almendros

**Antoñeta:** Variedad obtenida en el CEBAS del cruzamiento 'Ferragnès' x 'Tuono'. Es autocompatible y de floración tardía. El árbol tiene un porte abierto y una ramificación abundante. El rendimiento es del 35% y la época de maduración temprana. Es muy productiva y de semilla excelente.

**Carmel:** Descendiente espontáneo de 'Nonpareil', probablemente de un cruzamiento con 'Mission'. Fruto de cáscara blanda, sin semillas dobles, tamaño grande y productividad media.

**Desmayo Largueta:** También denominada 'Desmayo Blanco'. Conocida desde el siglo XIX en Tarragona, su cultivo se ha extendido en todo el levante peninsular, cultivándose incluso en el norte de África. A pesar de su floración extratemprana es una variedad de maduración muy tardía. Su principal característica es la excelente calidad de su semilla, por la que alcanza elevados precios en el mercado. Es autoincompatible.

**Ferragnès:** Variedad autoincompatible de floración tardía obtenida en la Grande Ferrade de Burdeos (Francia), del cruzamiento 'Cristomorto' x 'Aï'. Muy productiva y de cáscara semidura, con un rendimiento del 35%. Su semilla es grande, de sabor dulce y no produce dobles. En la zona mediterránea está muy extendida.

**Garrigues:** Variedad murciana, originaria del valle del Guadalentín. De floración temprana, autoincompatible, muy vigorosa y de productividad elevada. Su semilla, siempre sencilla y con un sabor ligeramente amargo, es utilizada con frecuencia para la obtención de patrones francos de almendro.

**Guara:** De origen desconocido, llegó en 1974 a la colección de almendro de la Unidad de Fruticultura del SIA de Zaragoza con denominación errónea. Es autocompatible y de floración tardía, con un porte medio y poco ramificado.

**Lauranne:** Variedad francesa autocompatible y de floración tardía obtenida en 1978 procedente del cruzamiento 'Ferragnès' x 'Tuono'. Árbol de vigor medio. La cáscara es semidura (35% de rendimiento) y su semilla de tamaño medio.

**Marcona:** Originaria de la provincia de Alicante. Autoincompatible, de floración y maduración medias. Variedad productiva, algo alternante y de fruto muy apreciado por su calidad. Debido a su elevado precio se comercializa separada de otras variedades.



**Marta:** Variedad autocompatible y de floración tardía, obtenida en el programa de mejora del CEBAS del cruzamiento 'Ferragnès' x 'Tuono'. El porte es erecto, muy vigorosa y con ramificación equilibrada. No tiene semillas dobles.

**Mission:** También denominada 'Texas' es una variedad Californiana autoincompatible de cáscara semiblanda, destaca como polinizador por la gran cantidad de polen que produce. Árbol muy vigoroso con frutos y semillas de tamaño pequeño.

**Ne Plus Ultra:** De origen californiano, floración temprana, se utiliza como polinizador de 'Nonpareil'. Fruto de tamaño grande con alto porcentaje de semillas dobles. Árbol muy vigoroso.

**Nonpareil:** Variedad californiana autoincompatible de cáscara blanda, con un gran rendimiento y muy productiva. Es la variedad que más se produce en el mundo (California, Chile y Australia principalmente). Utilizada como parental en muchas de las selecciones de origen californiano.

**Padre:** Descendiente del cruzamiento 'Mission' x 'Swanson', de cáscara dura y productivo. Utilizado como polinizador de distintas variedades. Susceptible a *Monilia* spp.

**Price:** Procedente de un cruzamiento entre 'Nonpareil' y 'Mission'. Fruto parecido a 'Nonpareil' de cáscara blanda con algunas semillas dobles. Árbol muy productivo, con las hojas verde muy intenso, utilizado como polinizador de muchas variedades.

**Ramillete:** Variedad murciana autoincompatible. Se le conoce también con el nombre de 'Sotera' o 'Del Soto'. Árbol muy vigoroso de porte erecto y ramificación media. Su flor es grande, de pétalos alargados de color rosado. De floración temprana, muy productiva, con cierta tolerancia a enfermedades y a la sequía.

**Sonora:** Variedad originaria de Davis (California) del cruce 'Nonpareil' x 'Eureka' de frutos grandes y elevado rendimiento al descascarado. Susceptible *Monilia* spp. Se utiliza como polinizador de muchas variedades de floración temprana.

### 2.1.3. PATRONES DE FRUTALES DEL GÉNERO PRUNUS

**Adesoto:** Es un clon de ciruelo 'Pollizo de Murcia' (*P. insititia*) seleccionado en la Estación Experimental de Aula Dei. Su afinidad es muy buena con todas las variedades de melocotonero y nectarina. Transmite a la variedad un vigor medio, una temprana entrada en producción y buena productividad. Además de adaptarse a suelos pesados y calizos, es un patrón tolerante a la salinidad y altamente resistente a la clorosis férrica. Se trata de un patrón con moderada resistencia a *Agrobacterium* y *Armillaria* y susceptible a *Phytophthora* (Pinochet y col., 1998).

**GF677:** Híbrido natural de almendro x melocotonero, obtenido en la Estación de la Grande Ferrade (Burdeos, Francia). Su multiplicación se lleva a cabo mediante cultivo *in vitro* y tiene buena afinidad con el melocotonero y el almendro. Se trata de un patrón muy vigoroso, resistente a la clorosis. Tiene un buen comportamiento en seco como patrón de almendro, así como en suelos calizos y pobres. Presenta relativa resistencia a *Phytophthora* y susceptibilidad a *Armillaria*, *Agrobacterium* y a nemátodos (*Meloidogine javanica* y *M. incógnita*) (Errea y Felipe, 1998).

**Mariana 26-24:** Se trata de un híbrido entre *P. cerasifera* y *P. munsoniana* procedente de California que se propaga fácilmente por estaquillado leñoso. Presenta buena afinidad con variedades poco exigentes de albaricoquero. Además de ser un patrón muy vigoroso, que induce una buena productividad, su principal interés radica en su gran resistencia a la asfixia radicular y su baja sensibilidad a la clorosis. Es moderadamente resistente a *Armillaria*, *Agrobacterium*, *Phytophthora*, así como a los nematodos *Meloidogine javanica* y *M. incognita*. Sin embargo es algo susceptible a *Verticillium* y muy susceptible al chancro bacteriano (Errea y Felipe, 1998).

**Mariana GF-8.1:** Se trata de un híbrido entre *P. cerasifera* y *P. munsoniana* procedente de la Grande Ferrade (INRA, Burdeos). Se propaga bien por estaquillado leñoso. Es un patrón muy vigoroso, induciendo buena productividad. Se adapta bien a terrenos húmedos y pesados, así como a suelos calizos. Presenta buena resistencia a *Armillaria*, *Agrobacterium* y *Verticillium*, así como a los nematodos *Meloidogine javanica* y *M. incognita* (Lichou, 1998).

**Mirobolán 29C:** Selección clonal de 'Mirobolán' (*P. cerasifera*) obtenida por Gregory Brothers en la Universidad de California-Davis. Se multiplica bien por estaquillado leñoso y su sistema radicular es bueno aunque superficial. Se emplea como portainjerto de ciruelo, cerezo y albaricoquero. Es un patrón muy vigoroso, moderadamente resistente a suelos húmedos y tolera bien la clorosis férrica. Fue seleccionado por su resistencia a nematodos de las agallas (*Meloidogine incógnita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla*). Sin embargo, es susceptible a *Pratylenchus vulnus* (Pinochet y col., 1998).

**Montclar:** Melocotonero obtenido en la estación experimental de la Grande Ferrade (INRA, Burdeos). Posee un gran vigor, muy buena compatibilidad con melocotonero, nectarina, almendro, ciruelo y algunas variedades de albaricoquero. Pese a su escaso vigor induce buena productividad. Se adapta mejor a suelos ligeros, francos y con buen drenaje. Este patrón se puede situar entre los mejores pies francos si no tenemos en cuenta su susceptibilidad a nemátodos.

**Nemaguard:** Seleccionado en California. Muy probablemente se trata de un híbrido entre melocotonero y *P. davidiana*. Induce un buen vigor a la variedad, imprimiendo un rápido crecimiento y un ligero adelanto en la maduración de los frutos. Presenta una buena afinidad con todas las variedades de melocotonero, nectarina, pavía y algunas variedades de albaricoquero, almendro y ciruelo. Respecto a la asfixia radicular, es menos sensible que otros francos. Muy sensible a clorosis y a terrenos calcáreos con pH elevado, así como a *Phytophthora*, *Armillaria* y *Verticillium* (Durán, 1993).

**Nemared:** Seleccionado por Ramming y Tanner (1983) en el USDA en Fresno (California). Se trata de un cruzamiento entre 'Nemaguard' y un descendiente de un melocotonero de hojas púrpura. Se multiplica por estaquillado leñoso. Su afinidad es buena con melocotonero, almendro, con la mayoría de las variedades de ciruelo japonés y regular con albaricoquero y ciruelo europeo. Se trata de un patrón vigoroso, poco ramificado y tolerante a condiciones de asfixia radicular. Sin embargo, es poco adecuado para terrenos clorosantes. Es un patrón tolerante a *Meloidogyne* pero muy susceptible a hongos del suelo como *Armillaria* (Errea y Felipe, 1998).

**Puebla de Soto** (Pollizo 105): Los pollizos son poblaciones de ciruelo pertenecientes al grupo San Julián (*P. insititia*) conocidas desde hace muchas décadas en la zona del Sur-Este español. Aunque se trata de poblaciones muy heterogéneas, se aprecia en ellas, su buena afinidad con la mayoría de variedades de ciruelo, melocotonero, albaricoquero e incluso almendro, así como su buen comportamiento en terrenos asfixiantes y clorosantes. Induce a la variedad un adelanto en la maduración, con frutos de mejor color y calibre. Además, presenta un buen comportamiento frente a las podredumbres de raíces causadas por *Armillaria* y *Rosellinia* (Durán, 1993).

**Pumiselect**<sup>®</sup>: Selección clonal de *P. pumila* (cerezo enano) obtenida en Geisemhein (Alemania). Es de multiplicación fácil y rápida, mediante cultivo *in vitro* y estaquillado leñoso. Presenta muy buena afinidad con melocotonero y buena con albaricoquero. Destaca por su capacidad de enanizar las variedades sobre él injertadas.

**Torinel**<sup>®</sup>: Ciruelo europeo seleccionado en el INRA de Francia. Procede del cruzamiento 'Reine Claudie d'Altan' x 'Reine Claudie de Bavay'. Se multiplica muy bien *in vitro*. Fue seleccionado expresamente como patrón de albaricoquero y es compatible con la mayoría de las variedades. De vigor medio, induce una entrada rápida en producción sin afectar al calibre de los frutos. Presenta un buen comportamiento en suelos húmedos y compactos, mostrando una buena resistencia a la asfixia radicular y tolerancia a la clorosis férrica. Es moderadamente resistente a *Phytophthora*, así como a nematodos *Meloidogine*, pero no a *Pratylenchus* (Pinochet y col., 1998).

**Evrica**: Patrón de ciruelo originario de Rusia, proveniente del cruzamiento [(*P. besseyi* x *P. salicina*) x *P. cerasifera*]. Posee un vigor medio con propiedades semi-enanizantes e inmune a nematodos de las agallas.

**CP-2**: Es un clon de ciruelo pollizo (*P. insititia*), seleccionado por Agromillora Catalana del 'Pollizo de Murcia'. Posee un vigor medio-bajo, compatible con ciruelo japonés y albaricoquero, pero incompatible con melocotonero y nectarina. Destaca su gran capacidad para adaptarse a diversos tipos de suelo.

**AC 9921-07:** Híbrido ciruelo x albaricoquero [(*P. besseyi* x *P. salicina*) x *P. armeniaca*]. Cruzamiento realizado en Agromillora Catalana, todavía en proceso de evaluación. Sería un buen patrón de albaricoquero y ciruelo, presentando un vigor escaso.

**STN2:** Selección rusa del cruzamiento *P. besseyi* x *P. cerasifera*. Es un patrón desarrollado para ciruelo, que en estos momentos se encuentra en fase experimental en el vivero Agromillora Catalana.

**L2:** *P. lannesiana* (especie cercana a *P. cerasus*), procedente de Rusia, compatible con cerezo dulce y ácido, con un vigor medio, aunque presenta un crecimiento muy rápido en condiciones de calor. Es resistente al frío. Como en los casos anteriores, se encuentra en periodo de evaluación en los viveros Agromillora Catalana.

**Lovell:** Selección californiana de melocotonero, utilizada también como patrón en esta especie, aunque también puede utilizarse en ciruelo y albaricoquero. De vigor medio, induce buena productividad. Presenta el inconveniente de no resistir los suelos pesados.

#### **2.1.4. Cruzamientos intra e interespecíficos**

El material vegetal utilizado en este apartado se puede estructurar en los siguiente grupos:

Cruzamientos intraespecíficos entre variedades de albaricoquero:

- Descendientes del Programa de Mejora del CEBAS-CSIC.
- Descendientes del Programa de Mejora del INRA de Avión.

Cruzamientos interespecíficos:

- Descendientes de *P. mandshurica* x albaricoquero 'Currot'
- Descendientes de cruzamientos entre melocotonero y almendro.

### 2.1.4.1. Albaricoquero x albaricoquero

Las descendencias intervarietales aquí estudiadas son fruto de cruzamientos, realizados entre variedades susceptibles a PPV (pero adaptadas al cultivo) y resistentes (donantes de la resistencia), dentro del programa de mejora del CEBAS de Murcia (Egea *y col.*, 1999). En concreto se han estudiado los descendientes que se encuentran en proceso de selección más avanzado. Los genitores utilizados fueron:

- Variedades resistentes: 'Goldrich', 'Lito', 'Avilara', 'A2408', 'A2564' y 'Orange Red'.
- Variedades susceptibles: 'Currot', 'Mauricio', 'Colorao', 'Pepito del Rubio', 'Guillermo', 'Búlida', 'Valenciano-4'.

Las 29 selecciones del programa de Mejora del CEBAS estudiadas proceden de los cruzamientos:

- |                               |                                   |
|-------------------------------|-----------------------------------|
| - 'A2408' x 'Currot'          | - 'Mauricio' x 'Goldrich'         |
| - 'Avilara' x 'A-2564'        | - 'Goldrich' x 'Búlida'           |
| - 'Goldrich' x 'A2564'        | - 'Colorao' x 'Goldrich'          |
| - 'Goldrich' x 'Currot'       | - 'Goldrich' x 'Pepito del Rubio' |
| - 'Goldrich' x 'Guillermo'    | - 'Lito' x 'Goldrich'             |
| - 'Goldrich' x 'Valenciano-4' | - 'Orange Red' x 'Currot'         |

Por otro lado se estudió un segundo grupo de descendientes pertenecientes al programa de mejora del INRA de Aviñon en Francia. Los genitores utilizados fueron la variedad 'Stark Early Orange' (resistente) y la variedad francesa 'Polonais' (susceptible). Los 213 descendientes estudiados proceden de los cruzamientos:

- 'Stark Early Orange' de polinización libre
- 'Polonais' x 'Polonais'
- 'Polonais' x 'Stark Early Orange'

#### 2.1.4.2. *Prunus mandshurica* x albaricoquero

Respecto a los cruzamientos inter-específicos el primer grupo de material vegetal ensayado fue una familia de 12 descendientes del cruzamiento *Prunus mandshurica* x la variedad de albaricoquero 'Currot'.

***Prunus mandshurica*:** Especie emparentada filogenéticamente con el albaricoquero, originaria de Centro Asia y en la actualidad cultivada en algunas regiones de China y Mongolia (Bailey y Hough, 1975). Se caracteriza por su resistencia a bajas temperaturas (Paunovic, 1988), habiendo sido utilizada en la mejora genética del albaricoquero como fuente de resistencia al frío (Dostalek, 1977). Presenta unos frutos de tamaño pequeño y escasa calidad gustativa debido a su gran acidez. Badenes *y col.* (1996), después de un estudio isoenzimático de diferentes materiales, especularon con la posibilidad de que el origen de la resistencia al PPV en albaricoquero se encontrara en esta especie.

**Currot:** Variedad valenciana de albaricoquero autocompatible, incluida dentro del grupo de los valencianos tempranos, madura durante la primera quincena de Mayo. Aunque los primeros años no muestra una gran productividad, pronto se estabiliza y comienza a producir bien. Se caracteriza por presentar una especial susceptibilidad al PPV (Avinent *y col.*, 1993; Rodríguez *y col.*, 1995).

#### 2.1.4.3. *Melocotonero* x almendro

En este segundo grupo se utilizaron diversas variedades y líneas de mejora de almendro y melocotonero, obtenidas en el Departamento de Pomología de la Universidad de California-Davis y facilitadas por el Dr. Gradziel, para comprobar la posibilidad de transmitir la resistencia entre estas dos especies.

**99,15-154:** Línea de mejora de melocotonero, proveniente de un retrocruzamiento entre una variedad de melocotonero y el almendro 'Nonpareil'.

**F8,5-156 y F8,5-166:** Líneas de mejora F2, provenientes de un cruzamiento entre una variedad de melocotonero y el híbrido melocotonero x almendro 'F10C,12-28'.

**F10C,12-28 y F10C,20-51:** Líneas de mejora provenientes de cruzamientos F2 entre la variedad de almendro 'Padre' y la línea de mejora de melocotonero '54P455'.

**10D,7-22:** Línea de mejora de melocotonero procedente del cruzamiento 'Padre' x '54P455'.

**Hansen 536:** Híbrido melocotonero x almendro obtenido en la Universidad de California por el Dr. Kester, destinado a ser patrón de melocotonero principalmente.

**Nickels:** Patrón de almendro y melocotonero, de origen norteamericano procedente del cruzamiento entre un almendro y el patrón 'Nemaguard'.

## **2.2. AISLADO DEL *PLUM POX VIRUS***

**RB3.30:** El aislado de PPV utilizado en todos los ensayos de esta Tesis es un Tipo Dideron obtenido a partir de la variedad de ciruelo 'Red Beaut' procedente de las Comunidades de Murcia y Valencia, conservado en la colección de PPV del IVIA de Valencia y facilitado por el Dr. Mariano Cambra. Es mantenido sobre melocotonero 'GF305'. Este aislado es representativo de la población de sharka en España (Asensio, 1996), y fue seleccionado por producir una buena sintomatología en 'GF305'.

## **2.3. EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA SHARKA**

La evaluación de la resistencia a la sharka fue realizada en condiciones controladas en invernadero o al aire libre en árboles infectados naturalmente con el virus.



### 2.3.1. Evaluación en condiciones controladas en invernadero

Para la evaluación de la resistencia al *Plum pox virus* se hace necesario disponer de un método eficiente, que permita la correcta evaluación de las plantas estudiadas. El método de evaluación en condiciones controladas en invernadero, consta de las siguientes etapas:

#### *Obtención del patrón*

La primera etapa del proceso de evaluación es la obtención de los patrones de melocotonero 'GF305' y albaricoquero 'Real fino', sobre los que posteriormente injertaremos los materiales a evaluar. El sistema de obtención de los patrones consistió en la estratificación convencional de los huesos en vermiculita a 7 °C. En primer lugar se desinfectaron las semillas con su endocarpo, mediante un tratamiento con TMTD [disulfuro de bis-(dimetiltiocarbamilo)] al 2% durante 20 minutos. Posteriormente se dejaron sumergidas en agua para favorecer su hidratación durante 24 horas. Después se introdujeron en bolsas de malla que fueron cubiertas con vermiculita humedecida y llevadas a una cámara a 7 °C (Figura 2.1), donde permanecieron en estratificación por un periodo de entre 90 y 100 días. Una vez que las semillas habían germinado, se sembraron en macetas de 3,5 litros, conteniendo una mezcla de turba y perlita en proporciones 4/5 y 1/5 respectivamente.

#### *Inoculación dirigida*

El método utilizado para la inoculación fue mediante el injerto de corteza o yema proveniente de plantas de 'GF305' previamente inoculadas y que presentaban síntomas muy fuertes de la enfermedad. Además, siempre se procuró utilizar como fuente de inóculo cortezas procedentes de brotes herbáceos, por su mayor efectividad en la transmisión del virus (Martínez-Gómez *y col.*, 2000). La inoculación se llevó a cabo sobre los patrones unos dos meses después de su germinación, cuando tenían unos 5 mm de diámetro y todavía mantenían poco lignificada su corteza, facilitándose la transmisión del virus.

### *Injerta de las variedades a evaluar*

Una vez que los patrones habían alcanzado el tamaño adecuado y habían sido inoculados, fueron injertados. El injerto utilizado fue del tipo escudete, consistente en la extracción de una yema de la varetta deseada e introducirla en el patrón mediante un corte en forma de "T", para posteriormente atarla fuertemente con una cinta de plástico especial para la injerta. Se realizaron dos modalidades de injerta. La primera, denominada a yema viva, se realiza durante el mes de mayo y la segunda se denomina a yema dormida en septiembre. En el primer caso, transcurridos unas dos semanas de la injerta se retiró el plástico. En el segundo caso los plásticos no se retiraron hasta pasadas 4 semanas, pues en este periodo el prendimiento de las yemas y el crecimiento de la planta son más lentos.

### *Ciclo de cultivo*

Una vez obtenido el patrón, inoculado con PPV e injertado con la variedad a evaluar, las plantas fueron mantenidas en mesas en un invernadero a prueba de insectos, con un sistema de refrigeración ("cooling") y malla de sombreo para el verano (Figura 2.1). El riego se efectuó manualmente en cada maceta, con una frecuencia variable dependiendo de las necesidades de la planta.

Al objeto de acelerar la evaluación de los materiales, las plantas fueron sometidas a un ciclo de crecimiento artificial, con unos periodos de letargo inducidos y unos periodos de crecimiento en invernadero. Para la inducción del letargo y posterior ruptura del mismo, las plantas se introdujeron en una cámara a 7 °C (Figura 2.1). A la salida de la cámara fría, las plantas fueron colocadas de nuevo en el invernadero.

El aporte de fertilizantes se realizó a través del agua de riego, con una periodicidad variable según el estado vegetativo de las plantas, que fue de cuatro semanas para plantas en pleno crecimiento. Cada dos meses se incorporó un aporte complementario de hierro en forma de quelato. Aunque el invernadero se encontraba en condiciones de aislamiento, se realizó un control fitosanitario preventivo al objeto de mantenerlo en perfectas condiciones sanitarias. La aplicación de los tratamientos se realizó cada quince días, alternando tres tratamientos diferentes (Anexo 1).



**Figura 2.1.** – Evaluación de la resistencia a la sharka en condiciones controladas en invernadero. A.- Invernadero a prueba de insectos donde se realiza la evaluación. B.- y C.- Exterior e interior de la cámara fría donde las plantas se someten a letargo artificial.

Este ciclo de crecimiento artificial favoreció el desarrollo vegetativo de los materiales y la aparición de síntomas tanto en el patrón como en la variedad injertada, evaluando más rápidamente los materiales ensayados (Audergon *y col.*, 1994; 1995c).

La evaluación de los materiales, en general se prolongó durante cuatro ciclos. En la Figura 2.2 podemos observar el esquema completo del proceso de evaluación, comenzando por la estratificación de las semillas, siembra, crecimiento, inoculación e injerta del patrón y el periodo de reposo.

Seguidamente se procedió al primer ciclo de evaluación, con la consiguiente observación de síntomas de la enfermedad en hoja, en el patrón y en la variedad tras unas 8 semanas de la salida del frío. Ésta debe ser realizada por un experto, por la cantidad de patologías y fisiopatías que pueden confundirse con los síntomas de la sharka.

La intensidad de síntomas fue valorada en una escala de 0 a 5:

0: ausencia total de síntomas

1: síntomas muy débiles y aislados

2: síntomas débiles en pocas hojas

3: síntomas intermedios en algunas hojas

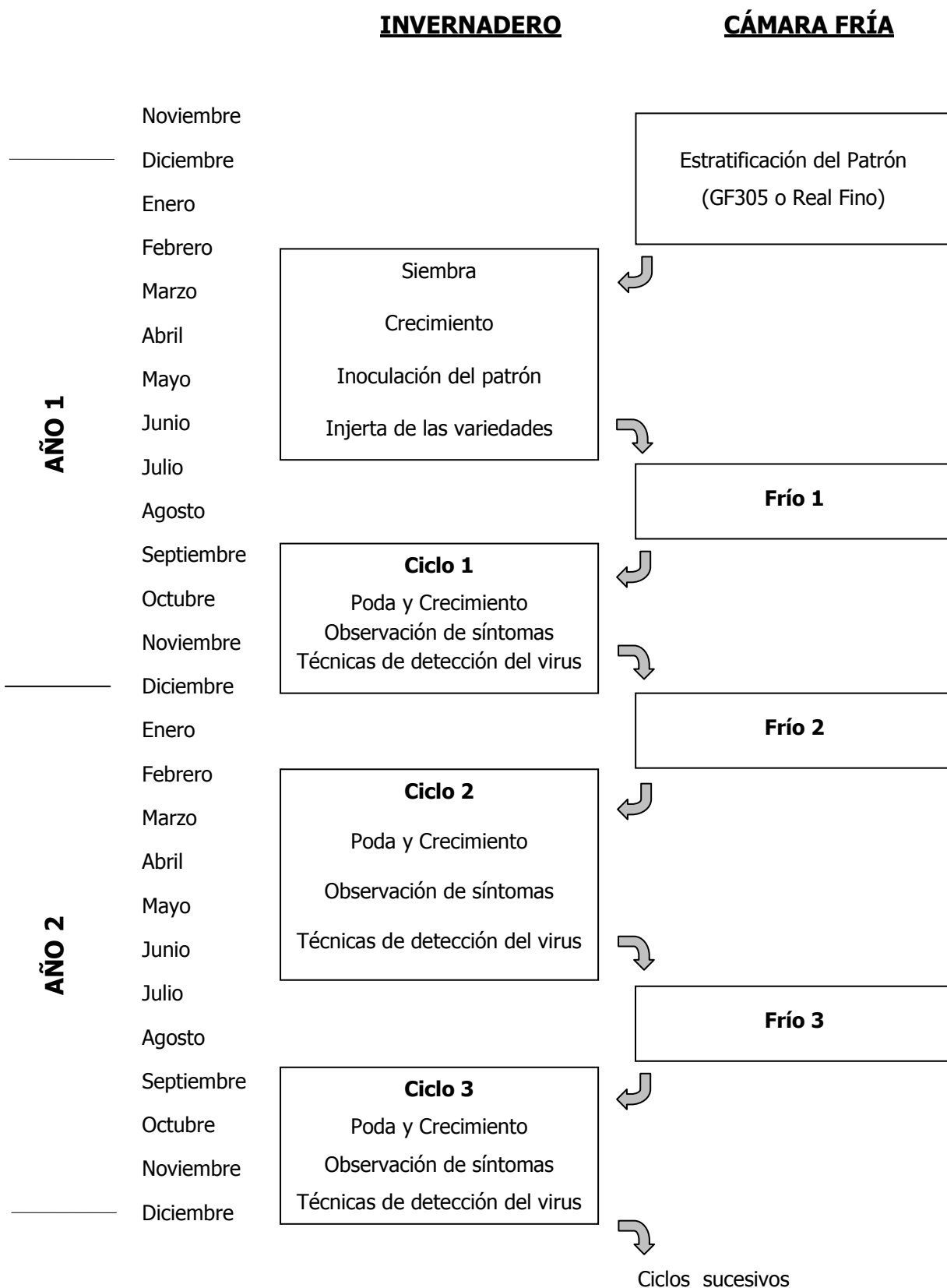
4: síntomas fuertes en numerosas hojas

5: síntomas muy fuertes generalizados por toda la planta

Estas medidas no son objetivas, por lo que la interpretación de los síntomas puede variar bastante según el observador. En nuestros ensayos, para evitar esta arbitrariedad, la toma de datos fue realizada siempre por las mismas dos personas.

Posteriormente se tomaron muestras de hoja para confirmar o descartar la presencia del PPV, mediante distintas técnicas de detección (ELISA, RT-PCR, hibridación molecular) y su localización en los tejidos, mediante inmunopresión de la proteína o impresión de ARN.

Después de unos cuatro meses en el invernadero, las plantas fueron sometidas de nuevo a un periodo de reposo de dos meses en la cámara fría y así durante sucesivos ciclos de estudio (Figura 2.2). Para la clasificación del nivel de resistencia del material vegetal en general la evaluación se ha realizado durante 4 ciclos.

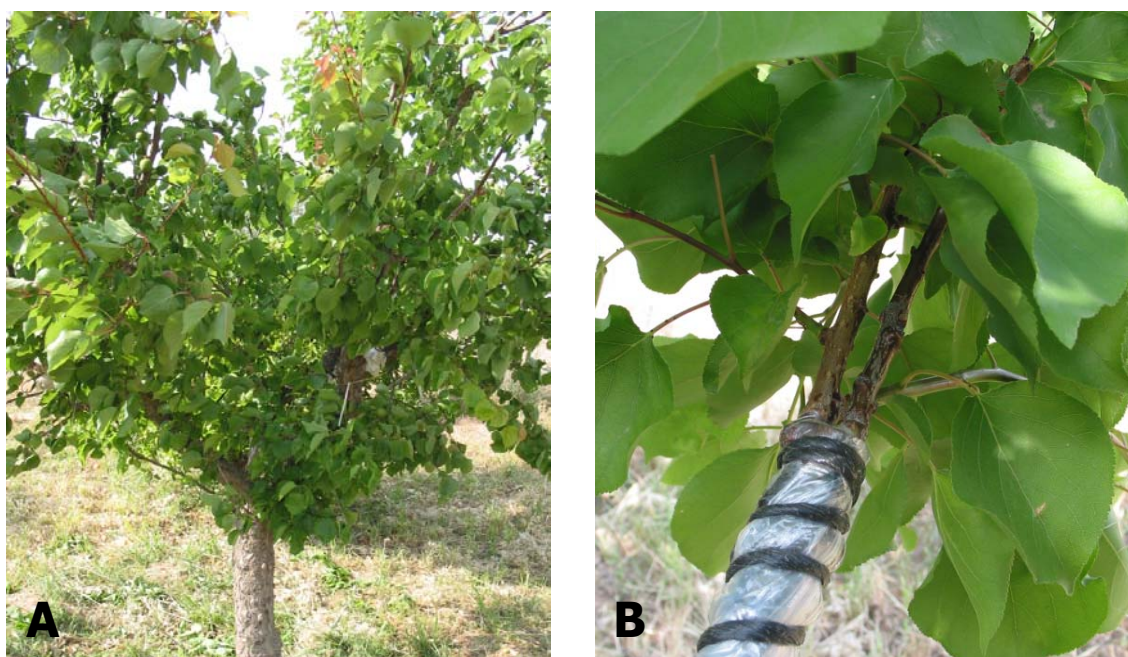


**Figura 2.2.** - Calendario del método de evaluación de la resistencia a la sharka en condiciones controladas en invernadero.

### 2.3.2. EVALUACIÓN EN CONDICIONES DE CAMPO

La evaluación en condiciones de campo se llevó a cabo realizando injertas del material a evaluar sobre árboles con síntomas de la enfermedad (Figura 2.3). Estos árboles eran por lo general de patrones francos, injertados a su vez con la variedad 'Pepito del Rubio'. Los árboles se encontraban en una parcela aislada con riego a manta situada en el término municipal de Abarán (Murcia).

La infección de dichos árboles fue de forma natural, por lo que desconocemos el aislado Tipo D de PPV y el momento exacto en que fueron infectados. Los árboles tenían 5 años de edad en el momento de la injerta y habían mostrado síntomas de sharka muy fuertes durante los dos años anteriores. La injerta se realizó en cuatro árboles distintos, poniendo entre una y tres yemas o "púas" de cada genotipo a evaluar. La observación de síntomas se realizó cada mes de mayo, tomando en ese momento muestras de hojas para su análisis mediante ELISA. Las plantas en campo fueron estudiadas entre 2 y 4 años consecutivos.



**Figura 2.3** – Evaluación en condiciones de campo. A- Árbol enfermo de sharka sobre el que se injertó parte de las plantas a evaluar. B- Detalle del injerto tipo "púa" en cabeza utilizado para la evaluación en campo.

## 2.4. TÉCNICAS DE DETECCIÓN DEL VIRUS

### 2.4.1. ELISA-DASI

La variante de la técnica ELISA utilizada fue la ELISA-DASI (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay - Double Antibody Sandwich Indirect) (Cambra *y col.*, 1994a). Esta variante es la más utilizada en los ensayos de detección del virus de la sharka (Lommel *y col.*, 1982; Cambra *y col.*, 1988, 1994a; Albrechtova, 1990).

La prueba se realizó en hoja en las plantas utilizadas como patrones y en las variedades injertadas sobre estos. Debido a la distribución errática de este potyvirus y la baja concentración viral típica en los *Prunus* (Marenaud y Yürektürk, 1974; Albrechtova, 1986; Audergon *y col.*, 1989, Töbiás *y col.*, 1992), en la toma de muestras para el ELISA se seleccionaron hojas jóvenes en pleno crecimiento para evitar en lo posible tomar muestras sanas de plantas enfermas (Dosba *y col.*, 1986; Albrechtova, 1990), realizándose el muestreo hacia las hojas que presentan síntomas o son algo dudosos.

La prueba consta de las siguientes etapas (Anexo 2):

- *Tapizado o sensibilización del inmunoadsorbente*: Consiste en la adición de las inmunoglobulinas policlonales específicas para la proteína de la cápsida del PPV, en tampón carbonato. Manteniéndose 4 horas a 37 °C.

- *Adición de la muestra*: Las muestras se trituraron con el tampón de extracción y el extracto vegetal fue depositado en los pocillos. Posteriormente se incubó la placa durante 16 horas a 4 °C y se lavó. En las muestras enfermas, el antígeno (la proteína de la cápsida del PPV) queda atrapado por el anticuerpo del tapizado.

- *Adición del anticuerpo monoclonal*: En cada pocillo de la placa se añadió la disolución de anticuerpos monoclonales específicos (5B-IVIA) del PPV en tampón, dejándola en incubación durante 2 horas a 37 °C, al objeto de que el anticuerpo se una a la proteína de la cápsida del virus.

- *Adición de inmunoglobulinas anti-ratón conjugadas con fosfatasa alcalina*: En cada pocillo se depositó la disolución de inmunoglobulinas marcadas con

fosfatasa alcalina dejándola en incubación 2 horas a 37 °C, para que se unieran al anticuerpo anteriormente depositado.

- *Revelado de la reacción y lectura de resultados:* Posteriormente se añadió una disolución de *p*-nitrofenilfosfato (sustrato de la fosfatasa alcalina) en cada pocillo. Este sustrato reacciona con la fosfatasa dando un color amarillento.

La placa se incubó a temperatura ambiente, realizándose las lecturas de la densidad óptica (DO) a 405 nm a los 60 minutos de la adición del sustrato. La muestra fue considerada enferma (ELISA +) cuando el valor de DO a 60 minutos superó dos veces la media de los controles sanos o negativos (Sutula *y col.*, 1986). En todos los análisis realizados fueron utilizados controles negativos y positivos de 'GF305' y de 'Real Fino'.

#### **2.4.2. Hibridación molecular no radioactiva**

Para la hibridación molecular no radioactiva se realizó un extracto de ácidos nucleicos totales de las hojas del material a evaluar, depositándolo sobre membranas de nylon cargadas positivamente (Roche) (Anexo 3). La sonda de hibridación marcada con digoxigenina, fue facilitada por el Dr. Vicente Pallás del IBMCP-CSIC de Valencia. La hibridación molecular utilizando la sonda de ARN marcada con digoxigenina, su posterior detección inmunológica y su revelado quimioluminiscente se realizó siguiendo esencialmente el protocolo descrito por Pallás *y col.* (1998) y mejorado por Herranz *y col.* (2005) (Anexo 3).

*Preparación de la membrana:* Esta membrana se dejó secar a temperatura ambiente durante 5 minutos para después fijar los ARNs mediante tratamiento con luz ultravioleta durante 3 minutos utilizando un transiluminador (Vilber Lourmat).

- *Prehibridación:* La prehibridación se realizó en un horno de hibridación (Mini Hybridisation oven, Ecogen) a 68 °C durante 2 horas con la solución de prehibridación.

- *Hibridación:* A continuación, se retiró la solución de prehibridación y se añadió la de hibridación, con la misma composición que la anterior pero



conteniendo la sonda dig-ARN (50-100 ng/ml). La membrana se incubó en dicha solución a 68 °C durante toda la noche.

- *Lavados*: Tras realizar la hibridación, la membrana se lavó 2 veces durante 5 minutos a temperatura ambiente con SSC 2x y SDS 0,1% y a continuación 2 veces durante 15 minutos a 68 °C con 0,1x SSC y SDS 0,1%.

- *Detección inmunológica*: se realizó incubando la membrana 5 minutos en el tampón de lavado, para posteriormente incubar durante 30 minutos con la solución de bloqueo. A continuación, se incubó la membrana durante otros 30 minutos con un anticuerpo anti-digoxigenina ligado a fosfatasa alcalina (Roche), diluido 1:10.000 en la solución de bloqueo. Para eliminar el exceso de anticuerpo no unido, la membrana se lavó 2 veces durante 15 minutos con el tampón de lavado, y posteriormente se equilibró durante 5 minutos en el tampón de equilibrado. Todos los pasos fueron realizados a temperatura ambiente.

- *Revelado quimioluminiscente*: Se realizó utilizando el substrato quimioluminiscente Lumigen CSPD®. La membrana se incubó en oscuridad con una dilución del substrato 1:100 en el tampón de equilibrado, durante 5 minutos. Después de retirar el substrato se incubó durante 15 minutos a 37 °C, para después exponer la membrana a una película Hyperfilm MP (Amersham Pharmacia), durante aproximadamente 20 minutos.

En cuanto a los controles de la hibridación, se utilizaron extractos de ARN totales de *Nicotiana benthamiana*, así como de melocotonero 'GF-305' y albaricoquero 'Real fino'.

### **2.4.3. RT-PCR**

Entre las diversas variantes de la PCR, en nuestros ensayos hemos utilizado la RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) (Wetzel *y col*, 1991a), consistente en la transcripción inversa del ARN del virus a su ADN complementario y su posterior amplificación. Las principales etapas del método fueron las siguientes (Anexo 5):

- *Extracción del ARN:* El ARN de las muestras fue extraído mediante un kit de extracción comercial "RNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit (QIAGEN)"(Anexo 4).

- *Transcripción inversa del ARN:* La transcripción del ARN a ADNc se realizó mediante la transcriptasa inversa AMV (Promega). Se tomaron 4 µl de la solución anterior y 2,5 µl del oligonucleótido empleado como cebador antisentido en la PCR. Esta solución se incubó 3 minutos a 85 °C y posteriormente se dejó 25 minutos a 50 °C para favorecer la linealización de la cadena de ARN y la adhesión de los oligonucleótidos.

- *Amplificación de la cadena de ADNc:* El ADNc obtenido fue posteriormente amplificado por medio de un termociclador Mastercycler de EPPENDORF. Se utilizaron dos parejas de oligonucleótidos, VP337-VP338 (Sánchez-Navarro *y col.*, 2005) y P1-P2 (Wetzel *y col.*, 1991a), que reconocen los extremos de una región de ARN que codifica la proteína de la cápsida.

Para la amplificación del ADNc se preparó una solución que contenía ADNc, tampón de la polimerasa, cloruro de magnesio, los dinucleótidos y los oligonucleótidos utilizados como cebadores, Taq-polimerasa (Promega) y agua. La solución antes mencionada se sometió a una serie de ciclos de amplificación en el termociclador con diferentes programas para cada pareja de cebadores (Anexo 5).

- *Visualización de resultados:* Después de la amplificación, las muestras fueron analizadas en un gel de agarosa (1%) mediante electroforesis y los ácidos nucleicos fueron teñidos con bromuro de etidio (sustancia que se intercala en la doble hélice de ADN) (Sambrook *y col.*, 1989). Posteriormente los geles fueron visualizados con luz ultravioleta con la ayuda de un transiluminador y finalmente fotografiados.

- *Interpretación de los resultados:* La aparición de una banda amplificada de ADN con un tamaño igual al comprendido entre los cebadores utilizados, 313 pb en el caso de VP337-VP338 ó 243 pb para P1-P2, nos indicó la presencia del virus en la muestra.

## 2.5. LOCALIZACIÓN DEL VIRUS

Los estudios de localización del virus se realizaron mediante las técnicas de inmunopresión de la proteína de la cápsida en membranas de nitrocelulosa y la impresión del ácido nucleico en membranas de nylon.

### 2.5.1. Inmunopresión de la proteína de la cápsida

Las impresiones de tejido se realizaron practicando cortes transversales utilizando cuchillas estériles, sobre los tallos y pecíolos objeto de estudio (Anexo 6).

- *Impresión de la muestra en la membrana:* La superficie de corte de estas muestras fue directamente presionada sobre una membrana de nitrocelulosa (Schleicher y Schuell) durante unos 5-10 segundos, evitando desplazamientos. Tras la impresión se procede a la fijación de las impresiones durante 1 hora a una temperatura de 80 °C. Esta fijación únicamente se llevó a cabo en caso de almacenamiento de las membranas. Una vez fijada se lavó con AFT.

Todo el proceso se realizó en tubos de horno de hibridación a los que añadimos 5 ml de las distintas disoluciones según el paso.

- *Bloqueo de la membrana:* Seguidamente procedimos al bloqueo de la membrana, consistente en la incubación de la membrana en agitación durante una hora a temperatura ambiente, en una solución de AFT y BSA. Posteriormente la membrana se lavó durante 5 minutos con solución de lavado AFT-Tween. Después se añadieron los anticuerpos monoclonales, realizándose su incubación en tampón AFT y BSA en agitación a 37 °C durante 2 horas. Finalmente se realizaron 2 lavados de 15 minutos.

- *Adición de inmunoglobulinas anti-ratón conjugadas con fosfatasa alcalina:* Consistió en la adición de inmunoglobulinas conjugadas con fosfatasa alcalina como anticuerpo secundario. Los anticuerpos secundarios se incubaron en solución AFT y BSA, a 37 °C durante 2 horas en agitación. Posteriormente se realizaron 2 lavados.

- *Revelado de la membrana*: Para el revelado se añadió la solución de sustrato colorimétrico "BM Purple AP" hasta que apareció el color púrpura (violáceo) en los testigos enfermos de *Nicotiana* (15 minutos). Entonces se retiró la solución y se lavó la membrana con agua destilada. La observación de las impresiones realizadas sobre la membrana se realizó mediante lupa binocular y microscopio óptico, pudiéndose apreciar una tonalidad azul-violácea en los cortes que presentan el virus así como distinguir los distintos tejidos de la planta.

### **2.5.2. Impresión del ácido nucleico**

Los cortes del material vegetal y la impresión se realizaron de manera similar a la inmunopresión de la proteína de la cápsida, pero en esta ocasión se llevo a cabo sobre una membrana de nylon cargada positivamente, durante aproximadamente 15 segundos. Los ácidos nucleicos se fijaron a la membrana mediante tratamiento con luz ultravioleta durante 3 minutos.

Seguimos el protocolo descrito por Más y Pallás (1995), similar al utilizado en la detección del virus mediante hibridación molecular no radioactiva. Las principales etapas del protocolo utilizado son (Anexo 7):

- *Construcción de la sonda*: La construcción de la sonda marcada con digoxigenina es la misma de la hibridación molecular (Anexo 3.1).

- *Preparación de la membrana (prehibridación)*: Se coloca la membrana en un baño a 68 °C en agitación con el tampón de hibridación durante 1 hora, retirándolo posteriormente.

- *Hibridación "dot-blot" con sondas marcadas con digoxigenina*: La sonda fue sometida previamente durante 2 minutos a 90 °C para facilitar su desnaturalización. Los ácidos nucleicos unidos a la membrana se hibridaron con la sonda de ARN marcada con digoxigenina en el tampón de hibridación durante 12 horas a 68 °C. Después se sometió a varios lavados con tampón de lavado, primero a 68 °C y posteriormente a temperatura ambiente.

- *Revelado quimioluminiscente de la membrana*: El primer revelado de la membrana se realizó mediante un procedimiento quimioluminiscente (Más y Pallás,

1995; Pallás *y col.*, 1997). La membrana se incubó con sustrato luminiscente CSPD durante 25 minutos. Después se expuso durante 1 hora a una película Kodak a 37 °C y se reveló. En las muestras enfermas, en la película aparece una señal indicativa de la presencia del virus, aunque no es posible observar su localización en los tejidos. Para esta localización precisa se procede al revelado colorimétrico.

- *Revelado colorimétrico de la membrana:* Para el revelado colorimétrico (Más y Pallás, 1995; Pallás *y col.*, 1997) se añadió la solución de sustrato colorimétrico (BM Purple AP) hasta que apareció el color púrpura en los testigos enfermos de *Nicotiana* (15 minutos). Entonces se retiró la solución y se lavó la membrana con agua destilada. La observación se realizó mediante lupa binocular y microscopio óptico pudiendo apreciarse coloraciones violáceas en las zonas con presencia de virus.

## **2.6. CLASIFICACIÓN DEL NIVEL DE RESISTENCIA**

De acuerdo con la clasificación descrita por Audergon y Morvan (1990) en los distintos ensayos de evaluación, los grupos tradicionalmente establecidos según su comportamiento frente el PPV han sido:

- Resistentes: no manifiestan síntomas y su ELISA es negativo.
- Tolerantes: no muestran síntomas pero su ELISA es positivo.
- Susceptibles: manifiestan síntomas y su ELISA positivo.

Esta clasificación estándar ha sido modificada en parte, de acuerdo a la experiencia previa de nuestro grupo de investigación en esta materia.

En primer lugar, es necesario indicar que en el caso de los materiales considerados resistentes (ausencia de síntomas y ELISA negativo) normalmente se aplicó la técnica de detección molecular RT-PCR para corroborar la ausencia del virus.

Por otro lado, la experiencia nos dice que la tolerancia es un estado transitorio hacia una futura susceptibilidad, que normalmente se pone de

manifiesto en los siguientes ciclos. Este retraso en la expresión de síntomas de las plantas susceptibles infectadas puede percibirse incluso durante un ciclo de observación, apareciendo los síntomas posteriormente a la toma de datos.

Por lo tanto, la clasificación del nivel de resistencia en esta Tesis Doctoral ha sido la siguiente:

- Resistentes: no manifiestan síntomas y su ELISA es negativo en todas las repeticiones, durante toda la evaluación.
- Poco susceptibles: es costosa su infección, muestran pocos síntomas y el ELISA es positivo. Además, algunas repeticiones pueden comportarse como si fueran resistentes, en algún ciclo.
- Muy susceptibles: la mayoría de las repeticiones muestran síntomas en todos los ciclos y son ELISA positivo.
- Indeterminados: cuando las plantas fueron evaluadas por diferentes métodos (invernadero y campo) y el comportamiento fue diferente.



### **3. Evaluación de la resistencia a la sharka en especies del género *Prunus***





### **3. EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA SHARKA EN ESPECIES DEL GÉNERO *PRUNUS***

#### **3.1. INTRODUCCIÓN**

Los trabajos sobre evaluación de la resistencia a la sharka en frutales comenzaron a finales de los años setenta en Grecia. Dichos estudios fueron realizados inicialmente en albaricoquero en condiciones de infección natural, mediante el cultivo de las variedades a evaluar en zonas donde la enfermedad estaba presente (Syrgiannidis, 1980).

Tradicionalmente en los países donde la enfermedad está muy extendida, como Grecia, Alemania, la República Checa o los países Balcánicos, la evaluación de la resistencia al PPV en frutales continúa realizándose en estas condiciones naturales de infección (Karayiannis, 1989; Petruschke y Schröder, 1995; Polák *y col.*, 1995, 1997; Rankovic *y col.*, 1999). Por otro lado, en países como Francia o España, con unos menores niveles de infección, ésta se realiza en invernaderos sellados en condiciones controladas (Audergon y Morvan, 1990; Audergon *y col.*, 1995b; Martínez-Gómez y Dicenta, 1999). Finalmente, en países de reciente introducción de la enfermedad como Canadá o EEUU, estos estudios se realizan en muchas ocasiones en Europa mediante colaboraciones internacionales.

Después de casi 30 años de investigaciones sobre el comportamiento de los frutales frente a la sharka, hoy en día todavía existen muchas incógnitas sobre diversos aspectos. Muchas de estas lagunas derivan de la correcta evaluación del nivel de resistencia del material vegetal estudiado. Esta cuestión es importante tanto para los estudios de transmisión y herencia de la resistencia, como para la correcta caracterización de las nuevas variedades creadas en los programas de mejora para la obtención de variedades resistentes al virus (Egea *y col.*, 1999; Karayiannis y Tsaftaris, 1999; Krška *y col.*, 2000).

La mayoría de los estudios sobre evaluación de la resistencia a PPV en *Prunus* han sido realizados en albaricoquero (Karayiannis, 1989; Audergon *y col.*, 1995; Polák *y col.*, 1997; Rankovic *y col.*, 1999; Martínez-Gómez y Dicenta, 1999), y en menor medida en ciruelo (Rankovic *y col.*, 1982; Kegler *y col.*, 1986, Paprstein *y col.*, 1998), y melocotonero (Rankovic *y col.*, 1986; Escalettes *y col.*, 1998; Polák *y col.*, 2003). Por otro lado, son mucho más escasos los estudios en almendro (Dallot *y col.*, 1996, Rubio *y col.*, 2003), cerezo (Dosba *y col.*, 1988), y otras especies de *Prunus* (Pascal *y col.*, 2002).

El proceso de evaluación de la resistencia en condiciones controladas, normalmente en invernaderos sellados, es un complejo proceso que combina la dificultad que supone el cultivo de árboles en condiciones no naturales y la complicada interacción entre la planta y el virus.

El proceso de evaluación en invernadero ya fue descrito anteriormente y comprende las siguientes etapas:

- Obtención del patrón, normalmente el melocotonero 'GF305' procedente de semilla.
- Inoculación del patrón mediante la injerta de yemas o cortezas procedentes de otras plantas infectadas con fuertes síntomas.
- Injerta de yema de los materiales a evaluar, sobre el patrón inoculado.
- Aplicación de periodos de frío artificial para conseguir dos ciclos de crecimiento anuales.
- Evaluación de la susceptibilidad mediante la observación de síntomas y aplicación de diferentes técnicas de detección (ELISA, RT-PCR, hibridación molecular) y localización del virus (inmunoimpresión de proteínas, impresión de ácidos nucleicos).

La optimización de la evaluación de la resistencia al PPV en condiciones controladas en invernadero pasa pues por la optimización de cada una de estas etapas. Finalmente, es necesario indicar el gran interés que supone validar en condiciones de campo los resultados obtenidos en el invernadero.

En este proceso de evaluación, la disposición de métodos fiables para la detección del PPV ha sido fundamental para profundizar en el comportamiento de este virus. La aplicación en rutina de un método de detección durante la evaluación del PPV es un paso crítico en los programas de mejora (Martínez-Gómez *y col.*, 2003). Durante los últimos años, han sido descritos un gran número de trabajos basados en técnicas serológicas y en la PCR, siendo la técnica ELISA la más usada (Martínez-Gómez *y col.*, 2000), y la PCR la más potente para detección (Crescenzi *y col.*, 1994). La hibridación molecular, a pesar de su buena aplicabilidad a la rutina, ha sido menos utilizada (Pallás *y col.*, 1998).

Por otro lado, a pesar de la sensibilidad de estas técnicas de detección, la distribución irregular del virus en las plantas leñosas (Albrechtova, 1986; Martínez-Gómez y Dicenta, 2001; Ferri *y col.*, 2002), supone una dificultad añadida en la detección del virus. Por tanto, las técnicas de localización del virus pueden ser de gran utilidad para complementar la detección del virus. Mediante la impresión de tejidos en membranas de nitrocelulosa o nylon se pueden detectar y localizar la proteína de la cápsida y los ácidos nucleicos en los tejidos a estudiar. La localización del PPV ha sido llevada a cabo mediante inmuno-impresiones en membranas de nitrocelulosa usando anticuerpos policlonales (Cambra *y col.*, 1994; Dicenta *y col.*, 2000) y anticuerpos monoclonales (Martínez-Gómez y Dicenta, 2001). La localización del ácido nucleico se ha realizado con sondas marcadas con digoxigenina (Martínez-Gómez y Dicenta, 2001).

La presencia de síntomas en las hojas es un indicador inequívoco de la presencia de la enfermedad y en consecuencia de la susceptibilidad de las plantas evaluadas. Sin embargo, la expresión de estos síntomas en las plantas susceptibles inoculadas puede ser muy variable en intensidad y en la permanencia durante el proceso de evaluación, sobre todo en las condiciones de cultivo en invernadero. Es frecuente que algunas de las repeticiones de un determinado genotipo susceptible muestren síntomas de sharka y otras no. Incluso una planta infectada que ha mostrado síntomas en un ciclo puede perderlos en ciclos consecutivos o viceversa. Esta situación se puede dar incluso en el indicador 'GF305'. Por ello, sería interesante buscar nuevas alternativas que nos permitieran la clasificación de cada genotipo de una forma más inequívoca. En este sentido, la capacidad de un determinado

genotipo para dejar pasar el virus a través de sus tejidos (movimiento a larga distancia) podría ser una herramienta útil para ser utilizada en el proceso de evaluación de la resistencia a sharka (Dicenta *y col.*, 2003).

El movimiento a larga distancia de virus en plantas es un proceso poco conocido pero de gran importancia en el establecimiento sistémico de la enfermedad. Este movimiento ha sido estudiado principalmente en hospedantes herbáceos (Hull, 1989; Maule, 1991; Nono-Womdim *y col.*, 1993). En el caso del PPV los únicos ensayos realizados en plantas leñosas se han desarrollado sobre el patrón susceptible ciruelo 'Mariana' (Ferri *y col.*, 2002). Estos ensayos indican un rápido movimiento a través de los brotes vigorosos de la planta principalmente en las zonas por debajo del punto de inoculación. Este movimiento ha sido descrito a través del floema en la mayoría de las plantas, siguiendo el transporte de los fotoasimilados (Hull, 1989; Gilbertson *y Lucas*, 1996). No obstante, también se ha descrito el movimiento de algunos virus a través del xilema (Nono-Womdim *y col.*, 1993; Séron *y Haenni*, 1996).

En este capítulo profundizaremos en los aspectos críticos del proceso de evaluación de la resistencia a la sharka de frutales en condiciones controladas, persiguiendo los siguientes objetivos:

- Comparación de la eficiencia del ELISA, RT-PCR e hibridación molecular, como técnicas de detección del virus.
- Localización del virus en los tejidos mediante inmunopresión de la proteína de la cápsida e impresión del ácido nucleico.
- Estudio del movimiento del virus a larga distancia como método alternativo de evaluación de la resistencia.
- Comparación de la eficiencia del método de evaluación de la resistencia en condiciones controladas en invernadero y en campo.
- Optimización del método de evaluación en invernadero en cada una de las etapas de más interés, estudiando el efecto del tipo de inoculación, del patrón utilizado, del momento de la injerta y del ciclo de estudio sobre la eficiencia en la evaluación.

### **3.2. MATERIAL ENSAYADO**

En cada uno de los ensayos de este capítulo se han utilizado diversos frutales del género *Prunus* que ya fueron descritos en el Apartado 2.1 de la presente memoria.

En los ensayos de comparación de técnicas de detección del virus, hemos utilizado las plantas indicadoras melocotonero 'GF305' y albaricoquero 'Real Fino' provenientes de semillas y caracterizadas por su elevada susceptibilidad al PPV.

En los estudios de localización del virus el grupo de materiales ensayados estuvo formado por las variedades de albaricoquero 'Stark Early Orange' y 'Real Fino', de melocotonero 'GF305', de ciruelo 'Santa Rosa', de almendro 'Nonpareil', y por los patrones de ciruelo 'CP-2' y 'Torinel', de cerezo 'L-2' y el híbrido interespecífico ciruelo x albaricoquero 'AC9921-07'. Estos materiales representan la variabilidad existente dentro del género *Prunus* en cuanto a su comportamiento frente al PPV, desde materiales muy susceptibles como el 'GF305' hasta otros resistentes como 'Stark Early Orange'.

En los estudios del movimiento del virus a larga distancia los ensayos se centraron únicamente en el melocotonero 'GF305' (muy susceptible al virus) y los albaricoqueros 'Stark Early Orange' (resistente) y 'Real Fino' (susceptible).

Para comparar la evaluación en condiciones controladas en invernadero y en condiciones de campo se ensayaron 29 descendientes de albaricoquero procedentes de cruzamientos intraespecíficos entre genitores resistentes y susceptibles pertenecientes al programa de mejora del albaricoquero del CEBAS-CSIC de Murcia. Estos descendientes representan la variabilidad habitual en un programa de mejora de albaricoquero.

Finalmente para la optimización del método de evaluación en invernadero utilizamos como patrones el melocotonero 'GF305' y el albaricoquero 'Real Fino', sobre los que injertamos de nuevo el melocotonero 'GF305', además de los albaricoqueros 'Real Fino' (susceptible) y 'Stark Early Orange' (resistente).

### **3.3. METODOLOGÍA**

#### **3.3.1. Comparación de las técnicas de detección del virus**

Las técnicas utilizadas para la detección del PPV fueron la técnica serológica ELISA-DASI y las técnicas moleculares de hibridación molecular no radioactiva y RT-PCR, descritas en los Apartados 2.3, 2.4 y 2.5, y en los Anexos 2, 3, 4 y 5.

Se han comparado las tres técnicas para determinar cual es más apropiada para su utilización en un programa de mejora de frutales para resistencia al PPV, en función de su sensibilidad y de su aplicabilidad a la rutina (facilidad de aplicación, tiempo de ejecución, coste de la inversión y de los análisis).

Para determinar la sensibilidad de las técnicas de detección se emplearon hojas enfermas de 'GF305' y 'Real Fino'. Se realizó un extracto a partir de 1 gramo de hoja y se estableció un rango de diluciones entre 1:5 ( $40 \times 10^3$  µg de tejido infectado) y 1:400.000 (0,1 µg de tejido infectado). Finalmente, para cada técnica se estableció la dilución máxima a la cual el PPV era detectado. También fueron considerados otros aspectos relacionados con su aplicabilidad a la rutina del programa de mejora.

#### **3.3.2. Comparación de las técnicas de localización del virus en los tejidos**

En este apartado hemos comparado la eficiencia de tres técnicas (descritas en el Apartado 2.5, Anexos 6-7) para localizar el PPV en los tejidos:

- Inmunoimpresión de la proteína
- Impresión del ácido nucleico con revelado quimioluminiscente.
- Impresión del ácido nucleico con revelado colorimétrico.

Eventualmente, también fue considerada su aplicabilidad como técnicas de detección.

El material vegetal ensayado había sido inoculado previamente y consistió en tallos y pecíolos de diferentes *Prunus* (Tabla 3.2). Tanto de los tallos como de los pecíolos, se practicaron cortes transversales consecutivos cada milímetro, alternando la impresión sobre las membranas de nitrocelulosa (localización de la proteína de la cápsida) y nylon (localización del ácido nucleico).

De cada planta se realizaron 10 cortes de tallo y pecíolo, aplicándose a la membrana de nitrocelulosa un revelado colorimétrico y a la de nylon un revelado quimioluminiscente y también colorimétrico. Posteriormente, una vez realizado el revelado, las membranas fueron observadas mediante lupa binocular y microscopio, con diferentes aumentos, para ver las zonas donde se localizó el virus.

Al objeto de garantizar la infección del material vegetal ensayado en los estudios de localización del virus se verificó la presencia de síntomas y del virus mediante ELISA positivo en las muestras elegidas.

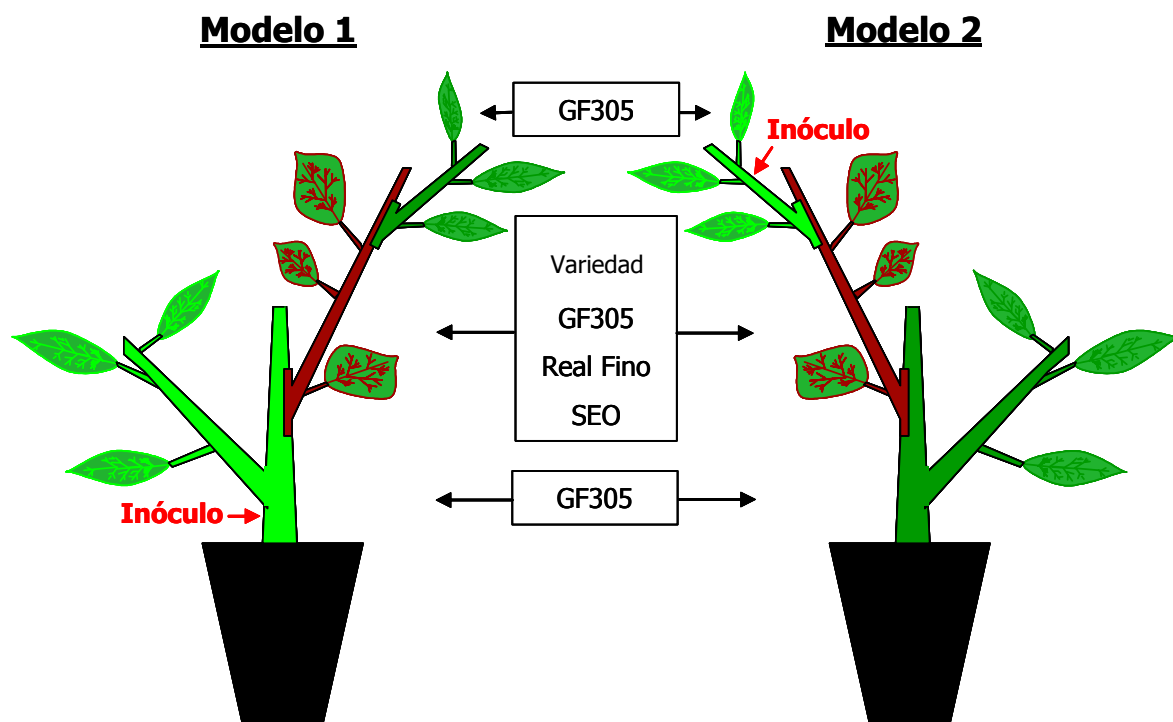
### **3.3.3. Estudio del movimiento del virus a larga distancia**

Al objeto de verificar la capacidad de los genotipos susceptibles y resistentes para dejar pasar el virus a través de sus tejidos (movimiento a larga distancia) hemos construido dos modelos diferentes de plantas (Figura 3.1):

Planta modelo 1: Es similar al método que hemos citado con anterioridad, es decir, germinación del patrón 'GF305', inoculación con el virus e injerta de la variedad a evaluar (albaricoqueros 'Real Fino' y 'Stark Early Orange', y melocotonero 'GF305' clonal). Tras el periodo de letargo se injertó una yema de 'GF305' sana sobre la variedad brotada.

Planta modelo 2: Tras la germinación del patrón 'GF305', se injertó la variedad (albaricoqueros 'Real Fino' y 'Stark Early Orange', y melocotonero 'GF305' clonal), para posteriormente injertar sobre ésta una yema de 'GF305' infectado. Tras el periodo de reposo, se produce la brotación de las yemas de 'GF305' enfermas.





**Figura 3.1.** Plantas modelo utilizadas para el estudio de movimiento del virus a larga distancia. Modelo 1: Inoculación con corteza en el patrón 'GF305'. Modelo 2: Inoculación mediante yema de 'GF305' infectada sobre la variedad a evaluar.

El estudio se ha llevado a cabo durante dos ciclos de crecimiento en invernadero en condiciones controladas y aplicando periodos de letargo artificial en cámara fría a 7 °C.

La observación de síntomas se realizó según nuestra escala (de 0 a 5) en el patrón 'GF305', en la variedad y en el 'GF305' superior. Para ratificar la presencia o ausencia del virus se aplicó la técnica ELISA-DASI según el protocolo del Anexo 2 y la RT-PCR (Anexos 4 y 5). El ELISA se practicó en todas las plantas en los ciclos 1 y 2 y en todas las partes (patrón, variedad y yema de inoculación o testigo). En cambio, la RT-PCR sólo se realizó a las variedades en el segundo ciclo de evaluación, al objeto de detectar de una forma más fiable la presencia del virus en estas variedades.

### **3.3.4. Evaluación de la resistencia en invernadero y en campo**

Para verificar la fiabilidad de nuestro método de evaluación a la sharka en invernadero, hemos evaluado la resistencia a la sharka de 29 descendientes del programa de mejora mediante dos métodos de evaluación:

- Evaluación en condiciones controladas en invernadero (Apartado 2.3.1).
- Evaluación en condiciones de campo, mediante injerta sobre árboles enfermos (Apartado 2.3.2).

A pesar de que ambos métodos fueron descritos anteriormente, a continuación recordamos sus principales etapas:

Evaluación en invernadero: Entre 3 y 10 repeticiones de cada descendiente fueron injertadas sobre el patrón 'GF305' previamente inoculado. Las plantas fueron sometidas a 4 ciclos de crecimiento artificial, con periodos en invernadero y periodos de letargo artificial en cámara fría a 7 °C y oscuridad. La evaluación del nivel de resistencia se realizó mediante la observación de síntomas en hoja en cada ciclo, 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.

Evaluación en campo: Los descendientes a evaluar se injertaron en la variedad 'Pepito del Rubio' (sobre patrón franco) que estaba muy afectada por la enfermedad. En el momento de la injerta los árboles tenían 5 años. La observación de síntomas en hoja y la prueba ELISA se llevaron a cabo una vez al año, en primavera. Se realizó una injerta por descendiente, evaluándolo entre uno y cuatro años.

### **3.3.5. Optimización de la evaluación de la resistencia en invernadero**

Al objeto de optimizar el proceso de evaluación de la resistencia en condiciones controladas en invernadero, se estudió el efecto que tenía el patrón, la

inoculación, la época de injerta y la edad de la planta, en este proceso de evaluación.

Mediante la injerta de materiales en distintas épocas, pretendimos también comprobar la manera de optimizar la evaluación en el invernadero, comprobando así como influyen las diferentes épocas de injerta en el comportamiento de patrones, variedades e inóculos.

En todas las plantas estudiadas se observó la intensidad de síntomas, sobre un número de 10 repeticiones de cada variedad ensayada, el melocotonero 'GF305', además de los albaricoqueros 'Real Fino' y 'StarK Early Orange'. Se estudiaron diferentes factores:

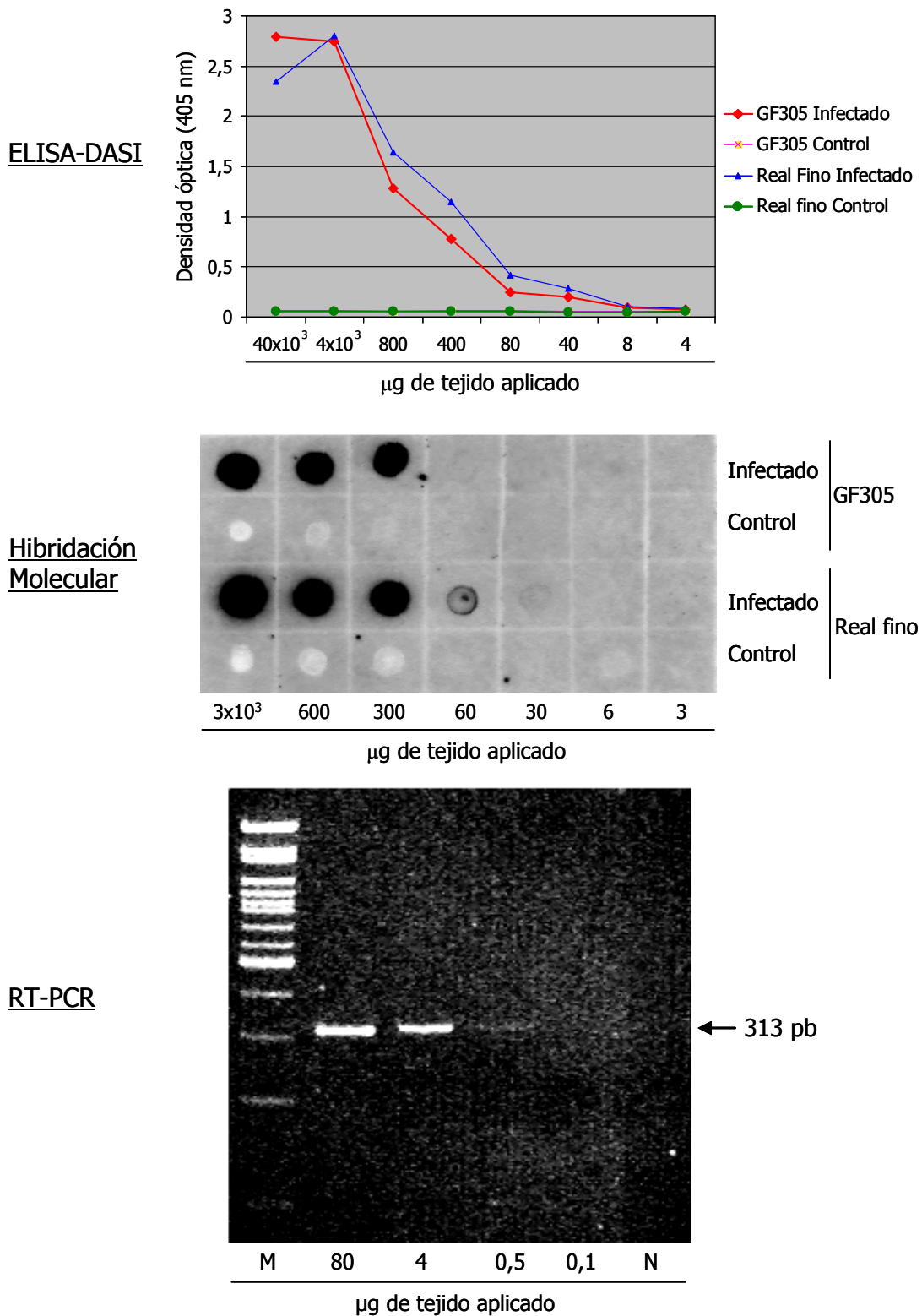
- Época de la injerta: se realizaron 4 injertas, en Mayo y Septiembre de 2003 y 2004.
- Tipo de inoculación: se ensayó la inoculación mediante injerto de corteza en el patrón (Modelo-1) y sobre la variedad con corteza o yema (Modelo-2).
- Patrón: los ensayos se realizaron sobre dos patrones francos, melocotonero 'GF305' y albaricoquero 'Real Fino'.
- Edad de la planta: se estudiaron 4 ciclos de crecimiento, durante dos años.

En total se han estudiado 2 patrones, injertados con 3 variedades, cada una con 10 repeticiones, que a su vez fueron inoculadas en el patrón o en la variedad, proceso que fue repetido en cuatro injertas, lo que supone un total de 480 plantas introducidas en el proceso de evaluación.

### **3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.4.1. Comparación de las técnicas de detección del virus**

Respecto a la sensibilidad de las técnicas utilizadas, el ELISA-DASI fue capaz de detectar el equivalente de 40 µg de tejido infectado tanto en el 'GF305' como en el 'Real Fino'. La sensibilidad de la hibridación molecular no radioactiva fue similar al ELISA. En el caso de la PCR se detectó hasta la dilución de 0,5 µg de tejido en el caso del 'Real Fino' (Figura 3.2).



**Figura 3.2.** Comparación de la sensibilidad ELISA-DASI, hibridación molecular y RT-PCR en un ensayo de diluciones de melocotonero 'GF305' y albaricquero 'Real Fino' inoculados con PPV que mostraban fuertes síntomas de la enfermedad. M.- Marcador de peso molecular (1Kb, Invitrogen). N.- Control negativo.

Sánchez-Navarro *y col.*, (1998), en contradicción con nuestros resultados, indicaron que la hibridación molecular no radioactiva fue claramente más sensible que los métodos serológicos como el ELISA-DASI. Sin embargo, la gran especificidad del anticuerpo monoclonal 5B-IVIA utilizado en nuestros ensayos, podría justificar nuestros resultados.

En el caso de la RT-PCR, las muestras infectadas mostraron una banda específica de 313 pb hasta la dilución de 0,5 µg de tejido en el caso del 'Real Fino'. Esta sensibilidad es la misma descrita para la IC-PCR por otros autores (Candresse *y col.*, 1994; Adams *y col.*, 1999). Por lo tanto, la sensibilidad de la PCR fue unas ochenta veces mayor que la del ELISA-DASI y la hibridación molecular no radioactiva (Tabla 3.1).

**Tabla 3.1.** Comparación de tres métodos diferentes para la detección del PPV: ELISA-DASI, hibridación molecular no radioactiva y RT-PCR.

Parámetros	ELISA-DASI	Hibridación molecular	RT-PCR
Sensibilidad <sup>1</sup>	1	1	80
Duración <sup>2</sup>	2	2	2
Interpretación resultados <sup>3</sup>	++++	+++	+++
Facilidad de aplicación a rutina <sup>3</sup>	++++	+++	++
Inversión inicial <sup>4</sup>	11.500	8.000	20.000
Costo por muestra <sup>5</sup>	0,66	0,33	1,66

<sup>1</sup>En comparación con la sensibilidad del ELISA-DASI.

<sup>2</sup>En días.

<sup>3</sup>Escala dada entre ++++ (bueno) y + (malo)

<sup>4</sup>Coste del equipo en €.

<sup>5</sup>Coste de la muestra en €.

Además de la sensibilidad de las técnicas, hemos considerado el tiempo necesario para obtener los resultados, la precisión en la interpretación de los

resultados, la facilidad de aplicación a la rutina, el costo de la inversión inicial y del análisis de cada muestra.

La duración de las diferentes técnicas de detección fue similar en todos los casos, siendo necesarios al menos dos días de trabajo, desde la toma de las muestras hasta la obtención de los resultados.

Respecto a la interpretación de los resultados, el ELISA supera a las otras dos técnicas, pues tenemos valores de densidad óptica (cuantificables) en cada una de las muestras, mientras que en la hibridación y la RT-PCR sólo manchas o bandas con mayor o menor intensidad (Tabla 3.1).

Globalmente debemos admitir que la PCR es con diferencia la técnica más sensible, aunque es muy costosa y tediosa de aplicar a la rutina. ELISA e hibridación molecular son menos costosas y la experiencia nos dice que, utilizando los protocolos adecuados, son suficientemente sensibles para nuestros estudios. Entre ellas es difícil la elección, pero el ELISA, aunque es algo más cara, es más fácil de aplicar rutinariamente a nuestros ensayos. La elección de la hibridación molecular queda condicionada a la facilidad para disponer de la sonda de hibridación.

#### **3.4.2. Comparación de técnicas de localización del virus en los tejidos**

Respecto a la detección del virus en las plantas ensayadas, la prueba ELISA ha puesto de manifiesto la presencia del virus en el melocotonero 'GF305', el albaricoquero 'Real Fino', el ciruelo japonés 'CP-2', el ciruelo europeo 'Torinel', el ciruelo japonés 'Santa Rosa', y el híbrido interespecífico 'AC9921-07' que además mostraba síntomas y se consideraron susceptibles. En cambio el almendro 'Nonpareil' y el cerezo 'L-2' no presentaron síntomas ni tampoco ELISA positivo, considerándolos resistentes (Tabla 3.2).

**Tabla 3.2.** Verificación de la presencia de sharka mediante observación visual de síntomas y la técnica ELISA-DASI.

Cultivar	Especie	Síntomas <sup>1</sup>	ELISA	DO <sup>2</sup>
GF305	<i>P. persica</i>	4	+	1.645
Real Fino	<i>P. armeniaca</i>	3	+	1.286
CP-2	<i>P. insititia</i>	3	+	1.758
Torinel	<i>P. domestica</i>	2	+	1.114
AC9921-07	<i>P. domestica x P. Armeniaca</i>	3	+	1.947
L-2	<i>P. lanesiana</i>	0	-	0.058
Nonpareil	<i>P. dulcis</i>	0	-	0.056
Santa Rosa	<i>P. salicina</i>	1	+	0.797

<sup>1</sup> 0 = ausencia de síntomas a 5 = máxima intensidad.

<sup>2</sup> Densidad óptica a 405 nm después de 60 minutos.

La distribución del PPV (proteína de la cápsida y ARN viral) se presenta de manera irregular en los tejidos (tallo y pecíolo), dentro de todas las especies del género *Prunus* estudiadas que mostraban síntomas y daban ELISA positivo, como el albaricoquero 'Real Fino', el melocotonero 'GF305', y los patrones de ciruelo 'CP-2' y 'Torinel'. En el caso del ciruelo 'Santa Rosa', a pesar de la presencia de síntomas y el ELISA positivo, la proteína y el ácido nucleico viral no fueron localizados debido a la baja concentración de partículas virales. En el caso del híbrido interespecífico 'AC9921-07' sólo fue localizado mediante la detección quimioluminiscente. Así mismo, el virus no se localizó en las plantas que no mostraron síntomas y habían sido ELISA negativo: 'Nonpareil' y 'L-2' (Tabla 3.3).

El procedimiento quimioluminiscente es una técnica de detección más sensible, como podemos comprobar en las variedades de la Tabla 3.3, pero no permite la localización en cada uno de los tejidos de la planta. Esto coincide con los resultados que afirman que la hibridación "dot blot" es más sensible que la detección serológica, como propuso Sánchez-Navarro *y col.* (1996) trabajando con CarMV (virus del moteado del clavel).

También, podemos observar una buena relación entre la localización de la proteína de la cápsida y la del ARN viral en los tejidos de los tallos y los pecíolos estudiados. La localización es bastante similar en todas las especies del género *Prunus* infectadas con el virus.

**Tabla 3.3.** Localización de PPV en secciones de tallo y pecíolo en diferentes especies del género *Prunus* mediante inmunopresión (proteína) e hibridación molecular (ARN) colorimétrica y quimioluminiscente.

Cultivar	Tejido	Secciones infectadas (%)		
		Proteína		Ácido nucleico
		Colorimétrica	Colorimétrica	Quimioluminiscente
GF305	Tallo	89	89	100
	Pecíolo	55	11	33
Real Fino	Tallo	10	99	100
	Pecíolo	0	89	81
CP-2	Tallo	60	100	100
	Pecíolo	0	14	42
Torinel	Tallo	0	0	0
	Pecíolo	0	30	40
AC9921-07	Tallo	0	0	40
	Pecíolo	0	0	50
L-2	Tallo	0	0	0
	Pecíolo	0	0	0
Nonpareil	Tallo	0	0	0
	Pecíolo	0	0	0
Santa Rosa	Tallo	0	0	0
	Pecíolo	0	0	0

Dentro de los tallos, el virus parece localizarse más en los tejidos vasculares (xilema y floema) y a veces en el córtex, el parénquima medular y la epidermis (Tabla 3.4, Figura 3.3). En los pecíolos, se sitúan en los haces vasculares (xilema y floema) y en ocasiones en el córtex y epidermis (Tabla 3.4). Debemos destacar el alto porcentaje de secciones infectadas encontrado en el esclerénquima de 'GF305', 'Real Fino' y 'CP-2'.

También se puede observar, en general, una mayor sensibilidad en la localización mediante el ácido nucleico junto con una mayor distribución por los diferentes tejidos de la planta.



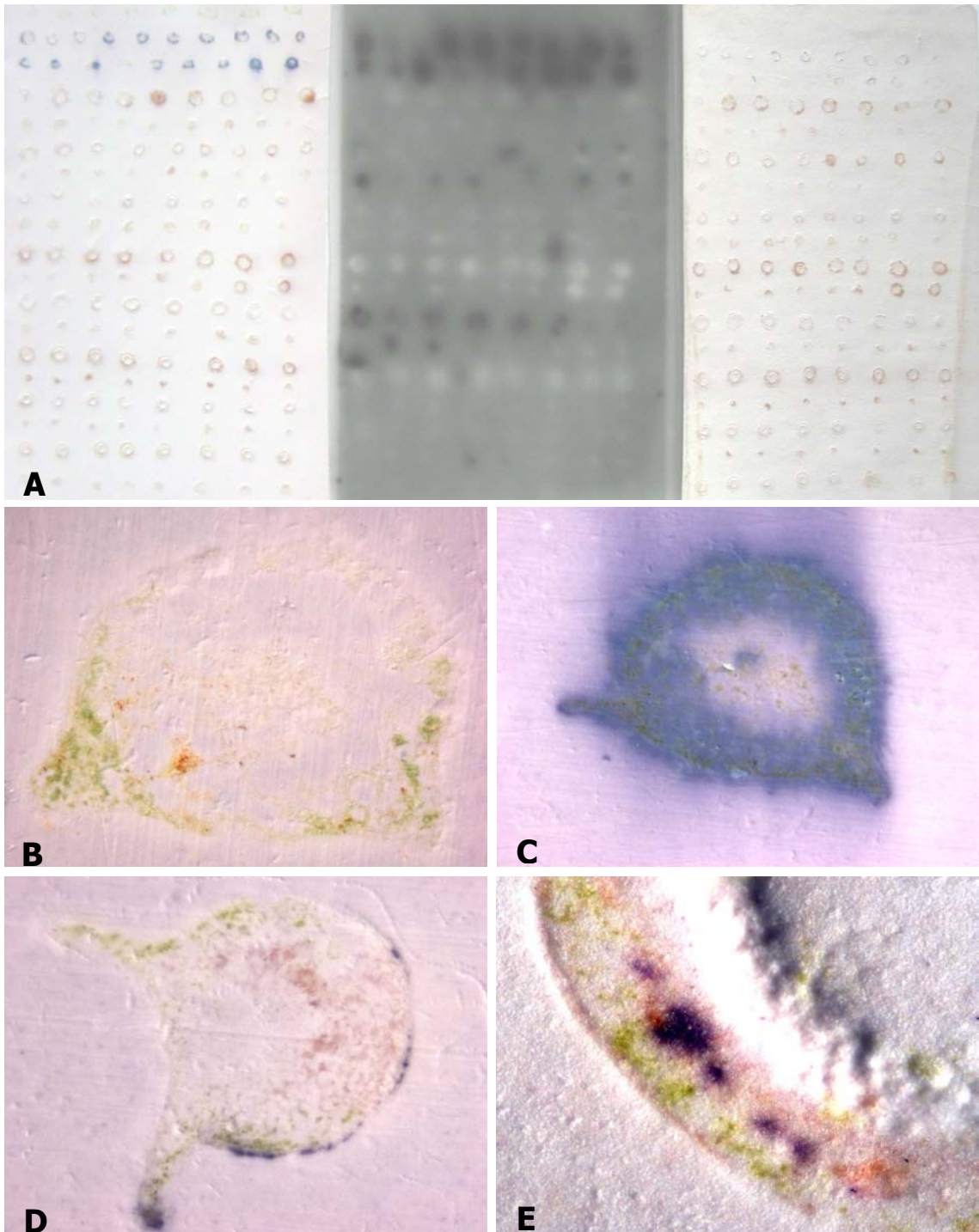
**Tabla 3.4.** Localización del PPV (proteína de la cápsida y ácido nucleico) en los tejidos de los tallos y pecíolos de diferentes especies del género *Prunus*. Porcentajes de impresiones infectadas en los diferentes tejidos de las secciones.

Cultivar	Tejido	Proteína <sup>1</sup>						Ácido Nucleico (colorimétrica)					
		Pm	Xi	F	Es	Co	Ep	Pm	Xi	F	Es	Co	Ep
GF305	Tallo	22	55	11	77			11	11	88	33		
	Pecíolo		44	44	-	22	11	11	11	-			
Real Fino	Tallo					10		20		70	50	20	
	Pecíolo				-		10	10	50	-	60	40	
CP-2	Tallo				60			20	10	100	40	20	
	Pecíolo				-			10		-			
Torinel	Tallo												
	Pecíolo				-				10	-		30	
AC9921-07	Tallo												
	Pecíolo				-					-			
L-2	Tallo												
	Pecíolo				-					-			
Nonpareil	Tallo												
	Pecíolo				-					-			
Santa Rosa	Tallo												
	Pecíolo				-					-			

<sup>1</sup> Pm= Parénquima medular, Xi= Xilema, F= Floema, Es= Esclerénquima, Co= CórTEX, Ep= Epidermis.

La distribución irregular del *Plum pox virus* en los tejidos de las especies del género *Prunus* ha sido descrita por diferentes autores que han encontrado una baja señal para la reacción inmunológica (Cambra y col., 1994; Dicenta y Audergon, 1994; 1995; Knap y col., 1995; Martínez-Gómez y Dicenta, 2001), como consecuencia de la baja concentración de virus y su distribución irregular (Albrechtova, 1986; Ferri y col., 2002). Además, Ferri y col. (2002) añaden la enorme importancia que puede jugar el estado vegetativo de la planta tanto en la localización del PPV, como en el movimiento, siendo más rápido en los brotes vigorosos.

Las técnicas de localización de la proteína de la cápsida y del ARN del PPV pueden ser útiles para el estudio del movimiento del virus y del nivel de resistencia al PPV, aportando una información adicional a las técnicas de detección, sobre la ubicación precisa del PPV en los tejidos.



**Figura 3.3.** Localización del PPV en tejidos de tallo y pecíolo. A.- Revelado colorimétrico de las membranas de nitrocelulosa (izquierda) y nylon (derecha), en el centro quimioluminiscente (nylon). B.- Impresión de un tallo de *Nicotiana* sin inocular. C.- Detalle de la impresión de un tallo de *Nicotiana* infectada. D.- Impresión de pecíolo de 'GF305' infectado, con presencia de PPV en cortex y epidermis. E.- Detalle de tallo de 'GF305' infectado, con el virus localizado en el esclerénquima.

Por otro lado, la distribución irregular del virus en la planta es un inconveniente para evaluar la resistencia de los descendientes en los programas de mejora, ya que podemos tomar muestras sanas de plantas enfermas. También puede afectar a la eficiencia en la inoculación de las plantas que van a ser evaluadas, ya que algunas fuentes de inóculo pueden no tener el virus.

### 3.4.3. Estudio del movimiento del virus a larga distancia.

En la Tabla 3.5 podemos observar los resultados del estudio del movimiento del virus a través de los tres genotipos de diferente susceptibilidad: 'GF305', 'Real Fino' y 'SEO'.

**Tabla 3.5.** Efecto de la variedad en el movimiento del virus a larga distancia. 'Modelo 1' la inoculación se realizó en el patrón 'GF305', en el 'Modelo 2' se llevo a cabo inoculando mediante yemas de 'GF305' enfermo, sobre las variedades.

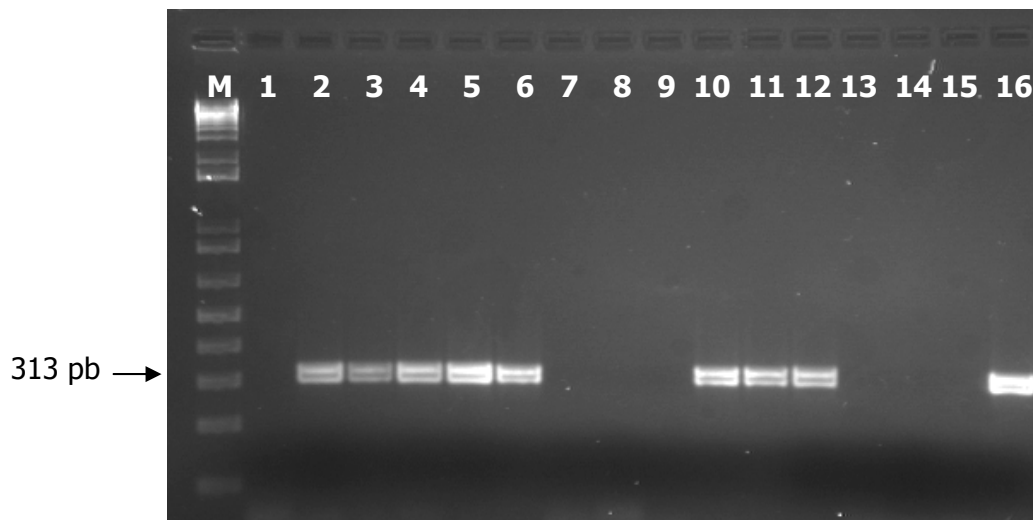
	Variedad	S	D.O	CICLO 1				CICLO 2				RT-PCR			
				Patrón GF305		Yema GF305		Patrón GF305		Yema GF305					
				S	D.O	S	D.O	S	D.O	S	D.O				
Modelo 1	GF305	1	3	2,193	1	0,878	-	-	2	2,669	0	0,093	4	2,720	Negativa
		2	3	2,686	1	0,778	1	2,679	3	2,030	1	0,732	3	2,404	Positiva
		3	1	1,798	1	0,342	2	1,394	3	2,668	1	1,035	2	2,649	Positiva
	R. Fino	1	2	1,611	1	0,904	1	1,683	2	2,642	1	1,566	2	2,541	Positiva
		2	3	2,181	1	2,674	-	-	4	2,651	3	2,643	1	2,656	Positiva
		3	2	2,444	0	0,073	1	2,205	4	2,650	2	2,674	-	-	Positiva
	SEO	1	1	1,557	0	0,075	0	0,082	3	2,636	0	0,094	0	0,108	Negativa
		2	2	2,114	0	0,080	0	0,086	2	2,653	0	0,115	-	-	Negativa
		3	2	2,587	0	0,150	0	0,131	4	2,596	0	0,092	0	0,085	Negativa
Modelo 2	GF305	1	0	0,086	1	0,397	3	1,786	1	1,049	1	2,691	4	2,638	Positiva
		2	3	1,269	1	0,837	4	1,523	3	2,638	1	2,000	1	2,639	Positiva
	R. Fino	1	1	1,829	1	1,389	2	1,905	4	2,681	1	2,681	2	2,650	Positiva
		2	2	2,680	0	0,140	3	2,681	0	0,094	0	0,093	3	2,655	Negativa
	SEO	1	0	0,083	0	0,070	2	1,021	0	0,088	0	0,089	4	2,645	Negativa
		2	0	0,061	0	0,071	1	1,538	0	0,086	0	0,089	2	2,650	Negativa

S= intensidad de síntomas; D.O: densidad óptica

'Real Fino' fue susceptible al virus, manifestando síntomas de la enfermedad y siendo ELISA positivo. Además, también permitió el paso del PPV a través de sus haces vasculares (movimiento a larga distancia) al lograr alcanzar el patrón sano 'GF305' en la Planta Modelo 2 y la yema sana de 'GF305' en la Planta Modelo 1, que también mostró síntomas de la enfermedad y fue RT-PCR positiva (Figura 3.4). En cambio, en la repetición 2 de 'Real Fino' en la Planta Modelo 2, durante el primer ciclo el virus fue capaz de atravesar sus tejidos, llegando hasta el patrón, aunque la variedad no mostró síntomas de la enfermedad, para posteriormente en el segundo ciclo desaparecer también en el patrón y ser la RT-PCR y el ELISA negativos. Esto es una prueba más de la variabilidad del comportamiento del PPV en los *Prunus*.

'Stark Early Orange' se ha mostrado resistente a la enfermedad, no permitiendo la multiplicación del virus en sus tejidos, con ausencia de síntomas y siendo ELISA negativo. Además, el patrón 'GF305' sobre el que estaba injertado no mostró síntomas de sharka en los tres casos a pesar de que la inoculación fue efectiva (Modelo 2) (Tabla 3.5). Estos resultados ponen de manifiesto la resistencia de este material al movimiento del virus a través de sus vasos conductores (a larga distancia), además de la resistencia a la multiplicación ya observada anteriormente por diferentes autores (Martínez-Gómez *et al.*, 2000). La RT-PCR de esta variedad también fue negativa (Figura 3.4).

En el caso de la variedad 'GF305' (usada como testigo) también se observó la multiplicación del virus y el movimiento del mismo a larga distancia, con presencia de síntomas en el 'GF305' usado en la inoculación, en la variedad y en el patrón, en los dos modelos estudiados (Tabla 3.5). También debemos destacar como el propio GF305 utilizado en una de las repeticiones no mostró síntomas (Modelo 1), ni ELISA ni RT-PCR positivo, a pesar de que el virus fue capaz de atravesar sus tejidos. Esto pone de manifiesto la dificultad de la evaluación de la resistencia a este virus, pues a veces es tan errático que incluso en los propios materiales utilizados habitualmente como testigos es difícil su detección.



**Figura 3.4.** RT-PCR de las variedades, Modelo-1: calle 1. GF305-1, 2. GF305-2, 3. GF305-3, 4. R. Fino-1, 5. R. Fino-2, 6. R. Fino-3, 7. SEO-1, 8. SEO-2, 9. SEO-3. Modelo-2: calle 10. GF305-1, 11. GF305-2, 12. R. Fino-1, 13. R. Fino-2, 14. SEO-1, 15. SEO-2, 16. Testigo positivo de melocotonero GF305. M marcador de peso molecular de 1Kb. Tamaño de la banda indicativa de la presencia de PPV (313 pb).

Los resultados indican pues que en el caso de la variedad resistente de albaricoquero 'Stark Early Orange' se produce una ausencia de multiplicación del virus, además de una ausencia de movimiento del virus a través de sus vasos conductores. Por otro lado, Dicenta *y col.* (2003) indicaron que las variedades de albaricoquero que estudiaron (resistentes y susceptibles al PPV) permitieron el movimiento del virus en torno al punto de inoculación. Sin embargo, mientras que en las variedades susceptibles observaron el movimiento a larga distancia, las resistentes no permitieron dicho movimiento.

La resistencia al movimiento del virus a través de la variedad a evaluar, puede ser un criterio de evaluación de la resistencia alternativo a la presencia de síntomas. Esta nueva forma de evaluar la resistencia puede tener algunas ventajas ya que, con independencia del genotipo evaluado, la observación de síntomas y el ELISA se realizarían siempre sobre la planta indicadora, donde ya conocemos el comportamiento frente al virus.

#### **3.4.4. Comparación de la evaluación en invernadero y campo**

Los descendientes estudiados se han estructurado en tres grupos en función de su comportamiento en invernadero y campo:

- Susceptibles: clasificados como susceptibles en invernadero y campo. En alguna ocasión mostraron síntomas y fueron ELISA positivo.
- Resistentes: clasificados como resistentes en invernadero y campo. Nunca han mostrado síntomas y siempre fueron ELISA negativo.
- Indeterminados: con un comportamiento diferente en invernadero y campo.

De los 29 descendientes, en 20 de ellos (69%) coincidieron los resultados de la evaluación en campo y en invernadero, y en los otros 9 (31%) esta evaluación fue diferente (Tabla 3.6).

En la Tabla 3.6 podemos observar como en los dos primeros ciclos de cultivo en el invernadero, el número de plantas evaluadas y la intensidad de síntomas de las mismas es mayor que en los ciclos tercero y cuarto. Además, podemos ver como, en general, la sintomatología observada no ha sido muy elevada, exceptuando casos como 'Z20207' que tuvo durante el segundo ciclo una intensidad de 4 en el invernadero y 'Z50607' en campo.

Un caso a destacar es el híbrido 'Z30806', el cual no ha mostrado síntomas ni en campo ni en invernadero, pero su ELISA fue positivo, por lo que podríamos considerarlo como tolerante (Audergon *y col.*, 1994). Esta clasificación podría ser un estado transitorio (como ya hemos comentado anteriormente) o podría deberse a un error en la observación de síntomas.

Así pues, para nosotros el concepto tolerancia lo cambiaríamos por distintos niveles de susceptibilidad, es decir, que podemos encontrar materiales muy fáciles de infectar, y otros en cambio muestran una dificultad mayor para ser infectados.

**Tabla 3.6.** Comparación de la evaluación de los descendientes de albaricoquero en condiciones controladas de inoculación en invernadero y en condiciones de campo. N= número de plantas evaluadas; I= número de plantas con síntomas; S= intensidad media de los síntomas; E= ELISA.

Descendientes	Ciclo 1				Ciclo 2				Ciclo 3				Ciclo 4									
	Invernadero		Campo		Invernadero		Campo		Invernadero		Campo		Invernadero		Campo							
	N	I	S	E	N	I	S	E	N	I	S	E	N	I	S	E						
S10201	2	1	2	+	0	+	0	-	2	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-		
S21016	1	1	1	+	2	+	0	-	2	+	0	-	2	+	0	-	1	0	0	-		
S40622	1	0	0	-	1	+	1	+	1	1	1	+	0	0	0	-	1	0	0	-		
Z20113	1	0	0	-	1	+	1	+	1	1	1	+	0	0	0	-	1	0	0	-		
Z20207	0	0	0	-	2	+	1	4	+	1	1	3	+	1	1	3	+	1	1	3	+	
Z20308	2	1	2	+	2	+	3	2	+	2	2	3	1	+	0	0	0	-	3	2	1	+
Z21118	2	0	0	-	2	+	1	1	2	+	1	1	2	+	0	0	0	-	2	1	2	+
Z21206	2	1	1	+	0	-	2	1	1	+	2	+	0	-	2	+	0	-	0	0	0	-
Z30806	1	0	0	+	0	-	1	0	0	-	0?	+	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-
Z50607	2	0	0	-	4	+	2	2	3	+	2	2	3	+	0	0	0	-	0	0	0	-
Z20315	3	0	0	-	1	+	3	0	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	1	0	0	-
Z20901	1	0	0	-	1	+	1	0	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	1	0	0	-
Z20920	2	1	3	+	0	-	2	0	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	2	1	1	+
Z30616	2	0	0	-	1	+	2	0	0	-	1	+	1	+	1	+	0	-	0	0	0	-
Z30812	1	0	0	-	1	+	2	0	0	-	1	+	1	+	0	-	0	-	1	0	0	-
Z40302	2	1	3	+	0	-	3	1	1	+	0	-	0	-	0	-	0	-	0	0	0	-
Z50502	1	0	0	-	0	-	1	0	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	1	0	0	-
Z50504	1	0	0	-	2	+	2	0	0	-	1	+	1	+	1	+	1	+	1	0	0	-
Z70101	1	0	0	-	0	-	1	0	0	-	0	-	0	-	0	-	1	+	1	0	0	-
S10242	2	0	0	-	0	-	2	0	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	0	0	-
S30111	1	0	0	-	0	-	2	0	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	0	0	-
S40133	1	0	0	-	0	-	2	0	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	1	0	0	-
S40432	2	0	0	-	0	-	3	0	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	1	0	0	-
Z20109	2	0	0	-	0	-	2	0	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	1	0	0	-
Z20917	3	0	0	-	0	-	3	0	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	3	0	0	-
Z21210	1	0	0	-	0	-	1	0	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	1	0	0	-
Z30814	1	0	0	-	0	-	1	0	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	0	0	-
Z50302	3	0	0	-	0	-	3	0	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	0	0	-
Z50405	2	0	0	-	0	-	3	0	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	1	0	0	-

**Susceptibles**

**Indeterminados**

**Resistentes**

En general, la observación visual de síntomas presenta una elevada fiabilidad en nuestro caso, pues de 217 observaciones sólo en 5 ocasiones no detectamos síntomas en plantas, que posteriormente fueron ELISA positivo (4 en campo y 1 en invernadero). Esto hace que, aunque el número de errores en la observación visual de síntomas es muy bajo, debamos realizar el análisis mediante ELISA a todas las plantas evaluadas.

Durante la experiencia adquirida en la evaluación de la resistencia a la sharka hemos podido observar una gran variabilidad en el comportamiento de los frutales frente a la sharka. Aunque normalmente los genotipos ensayados se comportan de manera similar, en otros casos, incluso tratándose del mismo genotipo, las repeticiones se comportan de un modo diferente. Incluso una misma planta puede dar resultados variables a lo largo de los diferentes ciclos.

Una vez clasificado cada genotipo como susceptible o resistente, hemos calculado el número de veces que cada planta (repetición) ha sido evaluada erróneamente (Tabla 3.7).

En el caso de las variedades clasificadas como resistentes, según el criterio establecido anteriormente, ninguna observación fue errónea. De 82 observaciones (58 en invernadero y 24 en campo), todas se mostraron resistentes. Tras cuatro ciclos de evaluación en ningún caso mostraron síntomas de la enfermedad ni fueron ELISA positivo, tanto en campo como en invernadero.

Sin embargo, en el caso de las variedades clasificadas como susceptibles, y debido al comportamiento errático de la enfermedad, en algunas ocasiones no se observaron síntomas y el ELISA fue negativo (comportándose erróneamente como resistentes). Esto hace que cometamos fallos temporales en la clasificación, llegando en la evaluación en invernadero al 52% de las observaciones, mientras que en campo se sitúa en el 23%. Es conocida la variabilidad de comportamiento que presentan los *Prunus* frente al PPV (Kegler *y col.*, 1998; Ranković *y col.*, 1999; Martínez-Gómez *y col.*, 2000).



**Tabla 3.7.** Número de errores cometidos sobre el total de plantas evaluadas en invernadero, en campo y en ambos conjuntamente (nº errores/Plantas evaluadas).

Descendiente	Invernadero	Campo	Total
<i>Susceptibles</i>			
S10201	4/5	0/1	4/6
S21016	0/1	0/3	0/4
S40622	2/3	0/1	2/4
Z20113	2/3	0/1	2/4
Z20207	0/3	0/1	0/4
Z20308	5/11	0/1	5/12
Z21118	3/5	0/1	3/6
Z21206	2/4	1/3	3/7
Z30806	2/3	3/4	5/7
Z50607	2/4	0/1	2/5
	22/42 (52%)	4/17 (23%)	26/59 (44%)
<i>Indeterminados</i>			
Z20315	8/8	1/2	9/10
Z20901	4/4	1/2	5/6
Z20920	5/8	1/1	6/9
Z30616	4/4	0/4	4/8
Z30812	7/7	0/4	7/11
Z40302	4/6	4/4	8/10
Z50502	4/4	2/3	6/7
Z50504	5/5	2/4	7/9
Z70101	2/2	3/4	5/6
	46/48 (95%)	14/28 (50%)	60/76 (78%)
<i>Resistentes</i>			
S10242	0/4	0/4	0/8
S30111	0/1	0/3	0/4
S40133	0/7	0/1	0/8
S40432	0/7	0/3	0/10
Z20109	0/7	0/1	0/8
Z20917	0/12	0/1	0/13
Z21210	0/4	0/1	0/5
Z30814	0/2	0/3	0/5
Z50302	0/8	0/3	0/11
Z50405	0/6	0/4	0/10
	0/58 (0%)	0/24 (0%)	0/82 (0%)
<b>Totales</b>	<b>68/148 (45%)</b>	<b>18/69 (26%)</b>	<b>86/217 (39%)</b>

En el caso de los descendientes clasificados como indeterminados, podríamos suponer que son susceptibles, al presentar en alguna ocasión alguna planta susceptible. Si aceptamos que son susceptibles, el porcentaje de error es muy elevado (en el 95% de las observaciones en invernadero y 50% en campo), pues son muy pocas las ocasiones en que se mostraron como susceptibles. Estos individuos que muestran cierta dificultad a ser infectados podrían considerarse como poco susceptibles (Apartado 2.6).

El comportamiento global al considerar los tres casos (resistentes, susceptibles e indeterminados), nos deja un porcentaje de error considerable, llegando al 45% en invernadero y al 26% en condiciones de campo, resultando una media del 39% para el total de las plantas estudiadas.

Esto pone de manifiesto las limitaciones de la evaluación de la resistencia en condiciones controladas en invernadero, que deben de ser compensadas con la evaluación de un número suficiente de repeticiones y durante varios ciclos. Actualmente, el número de repeticiones que evaluamos en el programa de mejora fluctúa entre 3 y 6, dependiendo del estado de selección, y son evaluadas al menos durante 4 ciclos.

La evaluación en campo parece más efectiva, pero al ser la sharka una enfermedad de cuarentena dicha evaluación no debería realizarse en estas condiciones. Una alternativa sería el cultivo en abrigos de cuarentena de árboles enfermos sobre los que injertar las variedades a evaluar. Esto sólo nos permitiría un ciclo de estudio por año y requiere mucho espacio y una infraestructura importante.

### **3.4.5. Optimización de evaluación de la resistencia en invernadero**

#### *Consideraciones generales sobre la preparación del material:*

El primer requerimiento para comenzar el proceso de evaluación consiste en construir las plantas (patrón y variedad) y en su inoculación efectiva.

Respecto al tiempo necesario para construir estas plantas (inoculadas e injertadas) observamos diferencias entre los dos modelos utilizados. En el Modelo-1 inoculamos e injertamos en el Ciclo 0, lo que permite la primera observación de síntomas en el Ciclo 1. En el Modelo-2 injertamos en el Ciclo 0 pero inoculamos en el Ciclo 1, por lo que la primera observación de síntomas la realizamos en el Ciclo 2.

Respecto a su aplicación en rutina, el Modelo-2 es más complicado ya que requiere la inoculación con una yema enferma, que una vez brotada nos confirme la eficiencia de la inoculación, sobre todo en el caso de variedades resistentes. Además, el número de inóculos disponibles es mucho mayor cuando se trata de un trozo de corteza (Modelo-1) que de yemas infectadas (Modelo-2). Finalmente, al inocular los patrones susceptibles facilitamos la multiplicación del virus en estas plantas jóvenes en pleno crecimiento, frente a la inoculación de la variedad con una yema, ya que la variedad en unos casos será susceptible, pero en otros resistente.

Sin embargo, el Modelo-2 permite evaluar la capacidad de una variedad a posibilitar el paso del virus, con independencia de que aun siendo susceptible y estando inoculada, muestre o no síntomas. Esta característica, que como vimos en el apartado 3.3.3, parece ser menos variable que la expresión de síntomas, podría evaluarse también modificando ligeramente el Modelo-1, si ponemos una yema sana de 'GF305' en la variedad injertada sobre el patrón 'GF305' enfermo. La disponibilidad de yemas sanas de 'GF305' es mucho mayor que de yemas enfermas. Este Modelo, que coincide con el Modelo 1 utilizado en el estudio del movimiento a larga distancia, combinaría las ventajas de ambos métodos:

- Elevada presión de inóculo.
- Evaluación rápida mediante la observación de síntomas en la variedad.
- Evaluación del movimiento del virus a través de sus tejidos, mediante la observación de los síntomas en la yema superior de GF305, en el siguiente ciclo.

En el Anexo 8, podemos encontrar los resultados detallados de la evaluación de las diferentes injertas a lo largo de los diferentes ciclos de evaluación.

### *Eficiencia de la injerta*

Respecto a la eficiencia en cada una de las injertas, es decir el porcentaje de variedades injertadas que finalmente brotan, no observamos ninguna influencia importante del periodo de injerta, siendo del 56% en primavera (Injertas 1 y 3) y del 50% en otoño (Injertas 2 y 4). La injerta más eficiente fue la 1 (72% de variedades brotadas) y la peor la 3 (36%). Globalmente el éxito fue del 53% (Tabla 3.8). Estos resultados podemos contrastarlos con los de Moustafa *y col.* (2001), que obtuvieron un porcentaje de éxito mayor cuando injertaron en otoño (90%) que en primavera (65%), aunque si tomamos sólo la primera injerta de primavera el éxito en la injerta fue similar. Estas diferencias pueden estar influenciadas, sobre todo, por la calidad de las yemas utilizadas. Además, Moustafa *y col.* (2001) en su estudio injertaron 2 yemas de cada variedad, por lo que podríamos incrementar nuestro éxito en la injerta simplemente injertando otra yema del material a evaluar.

Mientras que la injerta en primavera ha sido la más utilizada en la evaluación de la resistencia a la sharka, la de septiembre es la que han utilizado tradicionalmente los viveristas para la multiplicación vegetativa de frutales. La ausencia de diferencias entre ambas hace posible su utilización indistintamente, por lo que su elección tendrá que hacerse en función de otros parámetros, si los hubiera.

**Tabla 3.8.** Eficiencia en la injerta de las variedades 'GF305', 'Real Fino' y 'Stark Early Orange' ('SEO'), sobre dos patrones francos ('GF305' y 'Real Fino'), según los dos modelos de evaluación estudiados (Modelo-1 inoculación del patrón. Modelo-2 inoculación de la variedad), en 4 injertas diferentes (Injertas 1 y 3, primavera. Injertas 2 y 4, otoño. Número de plantas totales y brotadas (%) en cada injerta.

Modelo	Patrón	Variedad	Injerta 1		Injerta 2		Injerta 3		Injerta 4		Totales	
			Totales	Brotadas %	Totales	Brotadas %	Totales	Brotadas %	Totales	Brotadas %	Totales	Brotadas %
Modelo-1	GF305	GF305	10	8 80	4 40	2 20	9 90	40	23 58			
		Real Fino	10	7 70	3 30	4 40	3 30	40	17 43			
		SEO	10	7 70	4 40	5 50	5 50	40	21 53			
Total Modelo-1	Real Fino	GF305	10	8 80	7 70	4 40	10 100	40	29 73			
		Real Fino	10	8 80	4 40	6 60	6 60	40	24 60			
		SEO	10	9 90	2 20	8 80	6 60	40	25 63			
			60	47 78	24 40	29 48	39 65	240	139 58			
Modelo-2	GF305	GF305	10	8 80	3 30	2 20	9 90	40	22 55			
		Real Fino	10	7 70	2 20	6 60	6 60	40	21 53			
		SEO	10	5 50	1 10	5 50	7 70	40	18 45			
Total Modelo-2	Real Fino	GF305	10	7 70	7 70	1 10	7 70	40	22 55			
		Real Fino	10	7 70	4 40	3 30	4 40	40	18 45			
		SEO	10	5 50	2 20	2 20	4 40	40	13 33			
			60	39 65	19 32	19 32	37 62	240	114 48			
TOTAL			120	86 72	43 36	48 40	76 63	480	253 53			
GF305	GF305	GF305	20	16 80	7 35	4 20	18 90	80	45 56			
		GF305 o Real Fino	40	26 65	10 25	20 50	21 53	160	77 48			
		Real Fino	20	15 75	14 70	5 25	17 85	80	51 64			
GF305 o Real Fino			40	29 73	12 30	19 48	20 50	160	80 50			

Respecto a los dos modelos utilizados (inoculación en el patrón o en la variedad) no parece haber diferencias importantes entre ellos a este respecto. En general fue un poco más efectiva la primera, pero no parece razonable que la inoculación del patrón un mes antes de la injerta pueda tener un efecto positivo sobre el posterior desarrollo de la yema (sino todo lo contrario), por lo que las pequeñas diferencias tienen que deberse a otros factores.

Estos resultados ponen de manifiesto que las pérdidas en la construcción de las plantas que van a ser evaluadas son importantes desde el principio. Estas pérdidas deben de estar relacionadas con la viabilidad de las yemas injertadas (que depende principalmente de la variedad), de la pericia del injertador y de las condiciones de cultivo de las plantas.

Otro factor que podríamos considerar es el efecto que la compatibilidad patrón-injerto pueda tener sobre la brotación de las yemas injertadas. Si el patrón utilizado fue el franco de 'GF305', los resultados fueron algo mejores cuando la variedad injertada fue de la misma especie (el propio 'GF305', 58%) que cuando injertamos un albaricoquero ('Real Fino' o 'SEO', 48%), si bien las diferencias no fueron muy importantes.

En el caso del patrón franco de 'Real Fino', los resultados fueron de nuevo algo mejores en el caso de la variedad 'GF305' (64%) que cuando injertamos una variedad de su misma especie ('Real Fino' o 'SEO', 50%), por lo que nos hace pensar que en nuestro caso, la calidad de las yemas injertadas es más importante que la compatibilidad con el patrón. Es decir, las yemas del 'GF305' brotan algo mejor que las del 'Real Fino'. A pesar de todo, las diferencias no son muy importantes.

### *Eficacia en la inoculación*

El segundo aspecto importante de la evaluación es la inoculación efectiva de las plantas que van a ser evaluadas. En este sentido es interesante determinar la eficiencia del proceso y saber cual es el material más idóneo para ser inoculado.

En el Modelo-1, logramos infectar 98 de las 109 plantas de 'GF305' inoculadas (90%), mientras que en el caso del 'Real Fino' fueron infectadas 78 de 101 (77%). En el Modelo-2 los resultados fueron peores, siendo del 32% para el 'GF305' y del 41% para el 'Real Fino'. En el caso de 'Stark Early Orange', como era de esperar, no conseguimos inocular ninguna planta debido a la resistencia de esta variedad (Tabla 3.9).

Los resultados ponen de manifiesto claramente una mayor eficiencia de la inoculación sobre el patrón (Modelo-1) que sobre la variedad (Modelo-2). Además, entre las plantas que mostraron síntomas, éstos fueron más intensos en el Modelo-1. En este modelo, la eficiencia fue algo mejor en el 'GF305' que en el 'Real Fino'.

Tanto el éxito en la inoculación como la intensidad de síntomas, pueden estar relacionadas con la presión de inóculo, mucho mayor en el Modelo-1. Posiblemente la inoculación sobre el patrón joven (de unas 6 semanas) en pleno crecimiento ha favorecido la multiplicación inicial del virus, frente a la inoculación de la variedad injertada que en general tiene un menor crecimiento.

**Tabla 3.9.** Eficiencia en la inoculación sobre el patrón 'GF305' o 'Real Fino' (Modelo 1) y sobre la variedad 'GF305', 'Real Fino' o 'Stark Early Orange' (Modelo 2). Número de plantas inoculadas (N), número de plantas infectadas (n).

		Inoculadas	Infectadas	
Patrón		N	n	%
Modelo-1	GF305	109	98	90
	Real Fino	101	78	77
	Total Modelo-1	210	176	84
Variedad				
Modelo-2	GF305	43	14	32
	Real Fino	39	16	41
	SEO	29	13	44
	Total Modelo-2	111	43	39
Total		321	219	68

*Evaluación de las variedades injertadas*

Desde el punto de vista práctico, al mejorador que quiere evaluar el comportamiento de sus plantas frente a la sharka, lo que más le interesa es la eficiencia global de su método de evaluación. En este sentido, y sabiendo que el 'GF305' y el 'Real Fino' son variedades susceptibles a la sharka, y que en ambos métodos hemos partido del mismo número de plantas, podemos contabilizar el número de repeticiones de cada genotipo que se han podido evaluar correctamente.

La correcta evaluación de las variedades se ha realizado mediante la observación de la presencia (variedades susceptibles, 'GF305' y 'Real Fino') o ausencia ('Stark Early Orange') de síntomas en plantas eficientemente inoculadas.

Antes de presentar los resultados debemos recordar que el Modelo-2 (inoculación de la variedad) la evaluación comienza en el Ciclo-2, ya que en el Ciclo-1 es cuando se inoculan las plantas. También debemos recordar que en la Injerta-3 solo se llegó al Ciclo-3 y en la Injerta-4 al Ciclo-2.

El número de plantas de las que partimos en esta etapa es muy variable y es fruto del éxito de la injerta y de la inoculación. Consideramos que una planta podía evaluarse correctamente cuando mostró síntomas el patrón (Modelo-1) o la yema de inoculación (Modelo-2).

Antes de pasar a comentar los resultados de la evaluación de las variedades, queremos destacar lo sucedido en el caso de la variedad resistente ('Stark Early Orange'), a pesar de crecer sobre patrones infectados (Modelo-1) sólo una planta en una observación de las 117 realizadas (Injerta 3, Ciclo-2, sobre 'Real Fino'), mostró síntomas, si bien estos fueron muy débiles. Desconocemos si se trata de un error experimental (error en la injerta o en la identificación de la planta) o si realmente se trata de expresión de síntomas en la variedad resistente. En el caso del Modelo-2, de nuevo sólo en 1 observación de las 52 realizadas, pasó el virus al patrón 'GF305' (injerta 3, Ciclo-3). Al igual que en el caso anterior tenemos que poner en duda la autenticidad varietal de la planta evaluada, por ello estos 2 casos no han sido señalados en la tabla.



En el Ciclo 1 el 48% de las plantas susceptibles que estaban inoculadas mostraron síntomas (Modelo-1). En los ciclos sucesivos fue disminuyendo el número de plantas inoculadas. Así, en el caso del Modelo-1, el número de plantas en condiciones de ser evaluadas en los cuatro ciclos fue de 80, 60, 29 y 15. En el Modelo-2 fueron 82, 37 y 20. Esto ha debido ser consecuencia de las pérdidas que se van produciendo con el envejecimiento de las plantas a lo largo del proceso (Tabla 3.10).

De las 494 observaciones realizadas sobre variedades susceptibles correctamente inoculadas, en 133 casos conseguimos infectar la variedad. A esto habría que sumar las 169 observaciones realizadas sobre 'Stark Early Orange' correctamente inoculado, que no presentó síntomas. Es decir, en 302 ocasiones (el 61% de las observaciones) clasificamos bien a la variedad (resistente o susceptible) evaluada. Si comparamos este resultado con el obtenido en la comparación de la evaluación en invernadero y campo (Tabla 3.7), vemos que el porcentaje de observaciones correctas es casi idéntico (60%, 131/217).

Por otro lado, merece la pena señalar la diferencia de resultados obtenidos en ambos modelos de evaluación. Teniendo únicamente en cuenta las variedades susceptibles (las únicas que deben mostrar síntomas), de las 186 observaciones realizadas en el Modelo-1, en 108 (58%) observamos síntomas. En el Modelo-2 los resultados son mucho peores, ya que únicamente en 24 ocasiones (17%) logramos infectar la variedad injertada. Si nosotros añadimos las plantas de 'Stark Early Orange' evaluadas correctamente a las variedades infectadas, obtenemos un 74% de éxito en la evaluación en el Modelo-1, y subimos hasta el 40% en el Modelo-2. Estos resultados ponen de manifiesto la ineficiencia del Modelo-2 para evaluar la resistencia a la sharka. Moustafa *y col.* (2001) compararon dos modelos bastante similares a los nuestros, concluyendo la idoneidad del Modelo-1 pues obtuvieron porcentajes de evaluación del 66%, frente al 35% del Modelo-2, siendo algo más bajos que los nuestros.

Respecto a la conveniencia de utilizar el 'GF305' o el 'Real Fino' como patrón, al igual que en el caso de la época de injerta no encontramos diferencias a la hora de evaluar las variedades. Para ambos patrones el porcentaje observaciones sobre plantas susceptibles con síntomas fue muy parecido, del 55% y 61% respectivamente.

**Tabla 3.10.** Eficiencia en la evaluación de la susceptibilidad a la sharka de las variedades 'GF305', 'Real Fino' y 'Stark Early Orange' ('SEO'), sobre dos patrones francos ('GF305' y 'Real Fino'), según los dos modelos de evaluación estudiados (Modelo-1 inoculación del patrón. Modelo-2 inoculación de la variedad), a lo largo de 4 ciclos de crecimiento artificial.

Modelo	Patrón	Variedad	Ciclo 1		Ciclo 2		Ciclo 3		Ciclo 4		Total						
			Enf.	% Eval.	Enf.	% Eval.	Enf.	% Eval.	Enf.	% Eval.	Enf.	% Eval.	Enf.	% Eval.			
Modelo 1	GF305	GF305	18	21	86	10	19	53	5	10	50	2	5	40	35	55	64
		Real Fino	8	17	47	3	8	38	3	5	60	0	4	0	14	34	41
		SEO	0	21	0	0	18	0	11	0	0	0	0	5	0	0	55
Real Fino	GF305	GF305	20	24	83	8	15	53	2	5	40	3	3	100	33	47	70
		Real Fino	13	20	65	9	18	50	3	9	33	1	3	33	26	50	52
		SEO	0	21	0	0	22	0	11	0	0	0	8	0	0	0	62
Total Modelo-1 (sin SEO)			59	82	72	30	60	50	13	29	45	6	15	40	108	186	58
Modelo 2	GF305	GF305	4	22	18	0	4	0	0	4	0	1	3	33	5	29	17
		Real Fino	3	20	15	0	13	0	1	3	33	4	3	33	4	36	11
		SEO	0	19	0	0	8	0	0	2	0	0	2	0	0	29	0
Real Fino	GF305	GF305	5	21	24	3	7	43	5	8	63	13	8	63	13	36	36
		Real Fino	1	19	5	0	13	0	1	6	17	2	38	5	2	38	5
		SEO	0	10	0	0	8	0	0	5	0	0	5	0	0	23	0
Total Modelo 2 (sin SEO)			13	82	16	3	37	8	8	20	40	24	139	17			
Total			59	124	48	44	211	21	16	104	15	14	55	25	133	494	27
Modelo 1, sin SEO	GF305	GF305	26	38	68	13	27	48	8	15	53	2	9	22	49	89	55
		Real Fino	33	44	75	17	33	52	5	14	36	4	6	67	59	97	61
		SEO	0	42	0	0	69	0	0	38	0	0	20	0	0	169	0

Ambos patrones son igualmente fáciles de obtener pero mientras el 'Real Fino', en teoría, presentaría mejor compatibilidad con las variedades de albaricoquero, el 'GF305' permite diferenciar fácilmente el patrón de la variedad injertada durante la observación de síntomas, evitando la confusión.

### **3.5. CONCLUSIONES**

La PCR es la técnica más sensible, aunque es muy costosa y complicada de aplicar a la rutina. El ELISA y la hibridación molecular son menos costosas y suficientemente sensibles para nuestros propósitos. El ELISA es algo más caro pero más fácil de aplicar a la rutina del programa de mejora.

Las técnicas de localización de la proteína de la cápsida y del ARN viral del PPV aportan una información adicional a las de detección y son útiles para el estudio del movimiento del virus y del nivel de resistencia al PPV.

La resistencia al movimiento del virus a través de la variedad a evaluar, puede ser un criterio de evaluación de la resistencia alternativo a la presencia de síntomas, con la ventaja de que, con independencia del genotipo evaluado, la observación de síntomas y el ELISA se realizarían siempre sobre la planta indicadora, donde ya conocemos el comportamiento frente al virus.

La eficiencia del proceso de evaluación de la resistencia a la sharka ha sido muy baja, sobre todo en condiciones controladas en invernadero, lo que debe compensarse con el estudio de un número suficiente de repeticiones, durante varios ciclos de estudio. La evaluación sobre árboles adultos enfermos en campo es más efectiva, pero sólo nos permite un ciclo de estudio por año y requiere una infraestructura importante en abrigos de cuarentena.

En la optimización de la evaluación en invernadero, no se observaron diferencias importantes respecto a la época de injerta (mayo y septiembre) ni respecto al patrón utilizado (GF305 o Real Fino). La evaluación mediante el Modelo-1 (inoculación del patrón) fue con diferencia mucho más efectiva que mediante el Modelo-2 (la inoculación sobre la variedad), por lo que esta debe de ser descartada.

## **4. Comportamiento frente a la sharka en especies del género *Prunus***



## **4. COMPORTAMIENTO FRENTE A LA SHARKA EN ESPECIES DEL GÉNERO *PRUNUS***

### **4.1. INTRODUCCIÓN**

En estos momentos, la fruticultura moderna presenta una enorme oferta varietal, tanto de variedades tradicionales como de nuevas obtenciones. En las zonas afectadas por la sharka, cultivar material vegetal resistente a la enfermedad es un valor añadido para el agricultor. Así pues, es de gran interés el conocimiento del comportamiento frente al virus de las diferentes variedades cultivadas.

Como comentamos ampliamente en el Apartado 1.3, existe una gran diversidad de comportamientos frente al PPV dentro del género *Prunus*, pudiendo encontrar especies que generalmente son resistentes (como el almendro y el cerezo), otras de susceptibilidad generalizada (como el melocotonero), y otras en las que se pueden encontrar variedades susceptibles y resistentes (como el albaricoquero y el ciruelo).

También es interesante disponer de información respecto a la susceptibilidad de los patrones utilizados, ya que pueden ser infectados con PPV mediante pulgones en el vivero, antes de la injerta con la variedad. También pueden infectarse en campo, una vez injertados, en aquellos casos que tienden a producir sierpes. Éstas son especialmente atractivas para los pulgones y en consecuencia susceptibles de ser infectadas por el PPV, e incluso actuar como reservorios y fuentes de dispersión de la enfermedad en la plantación. LLácer (1995b) indicó como el patrón ciruelo Pollizo (*P. insititia*) ha servido de fuente de inóculo en la dispersión de la sharka en albaricoquero en la Comunidad Valenciana.

Por otro lado, la posible interacción entre la resistencia de la variedad y el patrón ha sido descrita por Sutic (1971) y Audergon *y col.* (1995) en estudios de campo en albaricoquero. Dragoiski *y col.* (2002) observaron diferentes velocidades en la dispersión de la sharka en campo entre diferentes combinaciones de variedad-patrón. Finalmente, Blazek *y col.* (2003) no encontraron ninguna influencia del patrón en el comportamiento de las variedades frente a PPV, ni en la dispersión de la enfermedad por las parcelas.

## **4.2. MATERIAL ENSAYADO**

El material vegetal utilizado en los diferentes ensayos fue descrito en el Apartado 2.1, por lo que a continuación pasaremos a describir más sucintamente el utilizado en cada ensayo.

### **Variedades frutales del género *Prunus***

#### *Variedades de albaricoquero*

Hemos evaluado 14 variedades de diversa procedencia, incluyendo las variedades tradicionales españolas 'Búlida', 'Canino', 'Chicano' y 'Real Fino'; las nuevas obtenciones del CEBAS-CSIC 'Dorada', 'Murciana', 'Rojo Pasión' y 'Selene'; las variedades norteamericanas 'Harlayne', 'Henderson', 'Orange Red', 'Sunglo', 'Stark Early Orange' y 'Veecot'; y la variedad de origen griego 'Lito'.

#### *Variedades de ciruelo*

En este grupo hemos evaluado 12 variedades de ciruelo japonés y europeo: 'Angeleno', 'Blackamber', 'Golden Japan', 'Friar', 'Ozark Premier', 'Obilnaya', 'President', 'Questch', 'Red Beaut', 'Santa Rosa', 'Silvery' y 'J300' (híbrido ciruelo x albaricoquero).

#### *Variedades de melocotonero y nectarina*

Han sido evaluadas 20 variedades incluyendo variedades tradicionales de Murcia como 'Chato', 'Calabacero' y 'Marujas'; otras de gran importancia económica como 'Babygold', 'Catherina' y 'Sudanell'; variedades de introducción reciente en España como 'Andross', 'Big Top', 'Flordastar', 'Halford', 'Loadel', 'Lovell', 'Snowqueen', 'Springcrest' y 'Zincal 5'; y variedades utilizadas en programas de mejora de melocotonero en California de reciente obtención como 'Ross', 'Rubidoux', 'Dr Davis' y '54P455'.

### *Variedades de almendro*

En el caso del almendro han sido estudiadas 16 variedades de diferentes orígenes. Estas variedades incluyen las variedades españolas 'Desmayo Largueta', 'Marcona', 'Ramillete', 'Guara', 'Marta', 'Antoñeta' y 'Garrigues'; las francesas 'Ferragnès' y 'Lauranne'; y las californianas 'Nonpareil', 'Carmel', 'Mission', 'Ne Plus Ultra', 'Padre', 'Price' y 'Sonora'.

### **Patrones de frutales del género *Prunus***

También han sido evaluados 15 patrones utilizados en las diferentes especies frutales del género *Prunus*. El 'GF305', patrón de melocotonero, se utilizó como control. Otros grupos incluyen patrones para melocotonero ('Montclar', 'Nemaguard', y 'Nemared'), almendro y melocotonero ('GF677'), albaricoquero ('Real Fino', 'AC 9921-07', 'CP-2'), albaricoquero y ciruelo ('Puebla de Soto', 'Torinel', 'Myrobolano 29C', 'Mariana 2624'), ciruelo ('Evrice', 'STN2') y por último cerezo ('L-2').

### **4.3. METODOLOGÍA**

La metodología seguida para la evaluación de la resistencia en condiciones controladas en invernadero de los distintos frutales del género *Prunus* fue descrita en los Apartados 2.3.1 y 3.4.5 de la presente memoria, siguiendo un procedimiento similar en todos los casos, excepto en la evaluación de los patrones. En este caso, en lugar de ser injertados sobre otro patrón, se evaluaron directamente sobre sus propias raíces, realizándose la inoculación en ellos mismos y evaluándose posteriormente de manera similar a las variedades. En este sentido, y de acuerdo a los resultados obtenidos en el apartado 3.4.1 de esta memoria, se realizó la observación visual de síntomas, la prueba ELISA-DASI en todas las variedades y patrones, y la RT-PCR en algunos de ellos para confirmar la ausencia del virus. Las variedades y patrones fueron agrupados en tres grupos según su comportamiento frente al PPV: con susceptibilidad alta, con susceptibilidad baja y resistentes.



## 4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.4.1. Variedades de frutales del género *Prunus*

#### 4.4.1.1. Albaricoqueros

Los resultados obtenidos tras la evaluación de las diferentes variedades de albaricoquero se muestran en la Tabla 4.1.

Las variedades podemos agruparlas según la susceptibilidad mostrada:

- Muy susceptibles: La mayoría de las repeticiones infectadas con presencia de síntomas y ELISA positivo en todos los ciclos de estudio. En este grupo podemos incluir las variedades 'Canino', 'Chicano', 'Dorada' y 'Real Fino' (Figura 4.1).
- Poco susceptibles: variedades susceptibles que muestran cierta dificultad para ser infectadas. Algunas repeticiones no muestran síntomas en algunos ciclos, o lo hacen en algunos de ellos y en general con poca intensidad. Podemos incluir en este grupo 'Búlida', 'Rojo Pasión', 'Murciana' y 'Veecot'.
- Resistentes: tras cuatro ciclos de estudio no han mostrado ni síntomas, ni ELISA positivo en ninguna de sus repeticiones. Es el caso de 'Harlayne', 'Henderson', 'Lito', 'Orange Red', 'Selene' y 'Stark Early Orange'.

Un caso a destacar es el de la variedad 'Búlida', que aunque es susceptible, mostró escasos síntomas (1,25-1,75) en la mitad de las repeticiones durante el primer y segundo ciclo, para en el tercer ciclo no mostrar síntomas y en el cuarto dar ligerísimos síntomas en una sola repetición y ser su ELISA negativo. Al ser 'Búlida' una de las principales variedades cultivadas puede haber contribuido a una menor dispersión de la enfermedad. Estas observaciones coinciden con las de Martínez-Gómez y Dicenta (1999) que describen a 'Bulida' como la variedad menos susceptible de las españolas evaluadas en su estudio, pero contrastan con la información facilitada por agricultores, que han observado fuertes síntomas en fruto.

**Tabla 4.1.** Evaluación de la resistencia al *Plum pox virus* de distintas variedades de albaricoquero. Número de plantas evaluadas (N), número de plantas con síntomas (intensidad media de síntomas), número de plantas ELISA positivo (densidad óptica media). RT-PCR: Negativa o positiva.

Variedades	N	Ciclo 1		Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4		RT-PCR
		Síntomas	ELISA	Síntomas	Síntomas	Síntomas	ELISA	
Búlida	10	4 (1,7)	4 (2,05)	5 (1,2)	0 (0,0)	1 (1,0)	0 (0,05)	
Canino	5	4 (1,7)	3 (0,40)	3 (2,0)	4 (1,0)	1 (1,0)	0 (0,07)	
Chicano	7	3 (1,3)	3 (0,56)	5 (1,6)	1 (2,0)	1 (1,0)	2 (0,61)	
Dorada	5	4 (1,5)	4 (2,35)	3 (3,6)	3 (1,3)	–	–	–
Harlayne	7	0 (0,0)	0 (0,08)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,08)	
Henderson	8	0 (0,0)	0 (0,06)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,07)	
Lito	10	0 (0,0)	0 (0,09)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,06)	Negativa
Murciana	6	0 (0,0)	0 (0,12)	2 (2,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,06)	
Orange Red	5	0 (0,0)	0 (0,06)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,05)	
Real Fino	10	6 (3,3)	6 (2,40)	5 (2,6)	5 (1,2)	3 (2,3)	3 (1,21)	Positiva
Rojo Pasión	7	1 (2,0)	1 (2,68)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,05)	
Selene	7	0 (0,0)	0 (0,07)	0 (0,0)	0 (0,0)	–	–	–
SEO	9	0 (0,0)	0 (0,07)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,07)	Negativa
Sunglo	8	0 (0,0)	0 (0,08)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,09)	
Veecot	9	1 (2,0)	1 (0,45)	2 (1,0)	0 (0,0)	3 (1,0)	3 (0,66)	

Intensidad de síntomas entre 0 (ausencia) y 5 (máxima)

Densidad óptica en los controles negativos de 'GF305' y 'Real Fino' entre 0,05 y 0,07

'Real Fino' ha confirmado su alta susceptibilidad, mostrando muchas repeticiones infectadas con numerosos síntomas, ELISA y RT-PCR positivos. Además hemos comprobado que puede ser un buen patrón para evaluar la resistencia a PPV, injertando sobre él otros albaricoqueros. Debido a su elevada susceptibilidad, también puede utilizarse como fuente de inóculo para infectar 'GF305' (Moustafa *y col.*, 2001a, b).

De entre las variedades susceptibles debemos destacar el caso de 'Veecot', que ha sido clasificada como resistente por diferentes autores (Dosba *y col.*, 1992; Sedlakova y Gallo, 1994; Karayiannis y Mainou, 1994; Audergon *y col.*, 1995b) a aislados Tipo Marcus, mientras que en nuestro ensayo fue susceptible a nuestro

aislado Tipo Dideron (considerado menos agresivo), coincidiendo con la evaluación dada por Polák *y col.* (1995) frente a aislados Tipo Marcus.

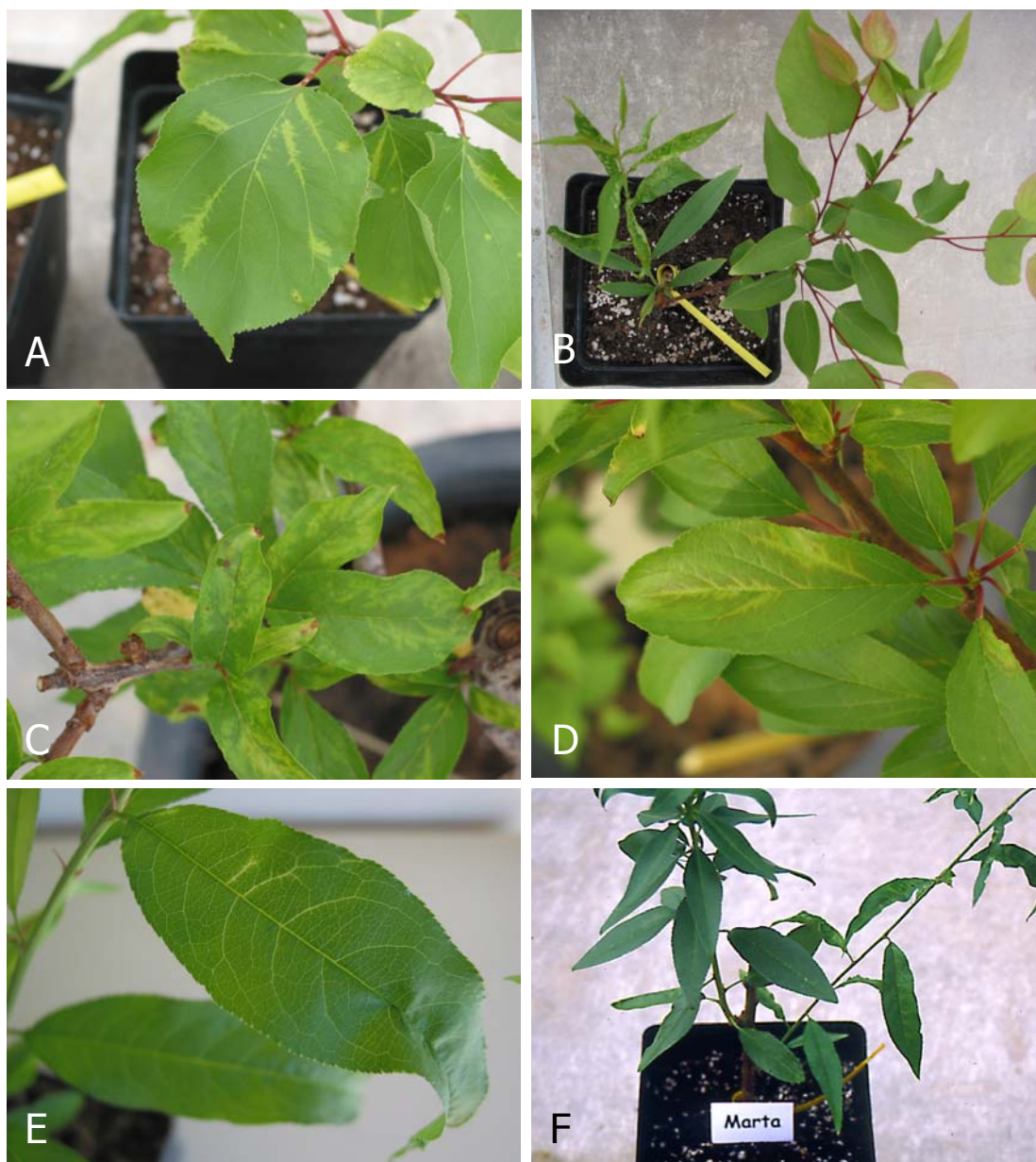
Las variedades que mostraron una baja susceptibilidad como 'Murciana' y 'Rojo Pasión' presentaron cierta dificultad para ser infectadas. Podemos observar que tan sólo una de las siete repeticiones y en uno de los 4 ciclos, 'Rojo Pasión' mostró síntomas de la enfermedad y fue ELISA positivo. De manera similar pasó con 'Murciana', en la que dos repeticiones mostraron síntomas en el segundo ciclo de evaluación, para después desaparecer en los Ciclos 3 y 4.

La variedad 'Sunglo' se ha mostrado como resistente a lo largo de los 4 ciclos de evaluación, contrastando con los resultados obtenidos por Rankovic *y col.* (1999) en los cuales fue susceptible también ante aislados Tipo Dideron. En ensayos con aislados Tipo Marcus se han obtenido resultados también dispares. En un caso se mostró susceptible (Balan y Stoian, 1995) y en otros resistente (Dosba *y col.*, 1992; Karayiannis y Mainou, 1994; Audergon *y col.*, 1995b; Karayiannis *y col.*, 1999). Este comportamiento hace que su clasificación como resistente no esté clara.

'Lito' se ha comportado también como resistente en nuestros ensayos, no presentando síntomas ni ELISA positivo ninguna de las 10 repeticiones evaluadas, confirmándose así lo descrito por otros autores con aislados Tipo M (Syrgiannidis y Mainou, 1991; Karayiannis y Mainou, 1994; Audergon *y col.*, 1995b; Karayiannis *y col.*, 1999).

La variedad 'Harlayne' está considerada como muy resistente por los diferentes investigadores que la han estudiado, tanto con aislados Tipo Marcus (Audergon *y col.*, 1995b; Karayiannis *y col.*, 1999) como Tipo Dideron (Fuchs *y col.*, 1998). Polák *y col.*, (1997) la consideran inmune. En nuestro caso hemos podido confirmar dichos resultados al mostrarse resistentes las 7 repeticiones evaluadas durante todos los ciclos de estudio.

Por otro lado, 'Henderson' es otra variedad que se ha comportado como resistente, sin síntomas en hojas ni ELISA positivo en ninguna de las 8 repeticiones evaluadas. Estos resultados confirman los obtenidos por otros autores (Audergon *y col.*, 1994 y 1995a). Por otro lado, otros ensayos con aislados Tipo M pusieron de manifiesto la susceptibilidad de esta variedad a estos tipos (Dosba *y col.*, 1988a, Balan y Stoian, 1995).



**Figura 4.1.** Diferentes variedades de *Prunus*. A.- Síntomas en albaricoquero 'Dorada'. B.- Resistencia del albaricoquero 'Henderson'. C.- Fuerte sintomatología en ciruelo 'Golden Japan'. D.- Detalle de clorosis nerviales en ciruelo 'Santa Rosa'. E.- Detalle de la leve clorosis nervial producida en melocotonero 'Big Top'. F.- Resistencia del almendro 'Marta'.

'Stark Early Orange' ha puesto de manifiesto su resistencia al aislado ensayado en los cuatro ciclos estudiados. Esta variedad fue una de las primeras descritas como resistente junto a 'Stella' (Syrgiannidis, 1980), resistencia que ha sido confirmada en numerosos ensayos de evaluación con aislados Tipo D y M (Dosba *y col.*, 1988a; 1991; Karayiannis, 1989; Audergon *y col.*, 1994; 1995b, c; Karayiannis y Mainou, 1994; Karayiannis *y col.*, 1999; Tradafirescu y Topor, 1999). Sin embargo, algunos autores han observado síntomas en hojas de esta variedad después de la injerta sobre árboles enfermos de sharka (aislado M), aunque eran muy débiles y temporales (Polák *y col.*, 1995b; 1997; Balan y Stoian, 1995). Esto podría indicar cierta susceptibilidad de esta variedad a aislados Tipo M, descritos como más agresivos en albaricoquero (Quiot *y col.*, 1995).

Por último, la nueva selección del CEBAS-CSIC 'Selene' se ha mostrado resistente a la enfermedad durante los cuatro ciclos de estudio.

#### 4.4.1.2. Ciruelos

El ciruelo es otra especie que en general se comporta como susceptible al PPV. En la Tabla 4.3 vemos el resultado de la evaluación de las variedades de ciruelo ensayadas. Siguiendo con nuestro criterio de caracterización de la susceptibilidad las hemos clasificado en los siguientes grupos:

- Muy susceptibles: todas pertenecen al grupo de los ciruelos japoneses, como 'Golden Japan', 'Read Beaut' y 'Santa Rosa'.
- Poco susceptibles: variedades de ciruelo europeo susceptibles pero en menor grado, como es el caso de 'Friar', 'Ozark Premier', 'Obilnaya', 'Questch' y 'Silvery'. En este grupo de variedades es posible observar variedades que no presentan síntomas ni ELISA positivo en alguno de los ciclos de estudio.
- Resistentes: tenemos a 'Angelino', 'Blackamber', 'President' y 'J300' (híbrido ciruelo x albaricoquero).

**Tabla 4.2.** Evaluación de la resistencia al *Plum pox virus* de distintas variedades de ciruelo. Número de plantas evaluadas (N), número de plantas con síntomas (intensidad media de síntomas), número de plantas ELISA positivo (densidad óptica media). RT-PCR: Negativa o positiva.

Variedades	N	Ciclo 1		Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4		
		Síntomas	ELISA	Síntomas	Síntomas	Síntomas	ELISA	RT-PCR
Angeleno	2	0 (0,0)	0 (0,06)	0 (0,0)	—	—	—	—
Blackamber	1	0 (0,0)	0 (0,05)	—	—	—	—	—
Golden Japan	7	3 (2,3)	3 (1,38)	5 (1,2)	7 (1,1)	4 (2,0)	4 (0,77)	Positiva
Friar	5	2 (1,0)	2 (0,82)	2 (1,0)	1 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,11)	Negativa
Ozark Premier	4	1 (1,0)	3 (0,77)	0 (0,0)	0 (0,0)	—	—	—
Obilnaya	1	1 (1,0)	1 (0,31)	—	—	—	—	—
President	1	0 (0,0)	0 (0,06)	—	—	—	—	—
Questch	1	1 (1,0)	1 (1,25)	0 (0,0)	—	—	—	—
Red Beaut	8	6 (3,5)	6 (1,91)	7 (2,85)	8 (3,2)	7 (4,0)	7 (1,40)	Positiva
Santa Rosa	5	2 (1,0)	2 (0,70)	4 (2,5)	4 (1,2)	2 (1,5)	2 (2,32)	Negativa
Silvery	4	2 (1,0)	2 (0,22)	2 (1,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,25)	Negativa
J300	2	0 (0,0)	0 (0,07)	0 (0,0)	—	—	—	—

Intensidad de síntomas entre 0 (ausencia) y 5 (máxima)

Densidad óptica en los controles negativos de 'GF305' y 'Real Fino' entre 0,06 y 0,08

La sintomatología del PPV en las variedades de ciruelo, fue generalmente de mayor intensidad que en el resto de *Prunus*, sobre todo en las variedades de ciruelo japonés (Figura 4.1). Éstos presentaron las típicas clorosis nerviales, junto con punteados cloróticos generalizados en algunas hojas, observándose en algunos casos anillos cloróticos. Cuando los síntomas eran muy fuertes, incluso se observó el envejecimiento prematuro y caída de las hojas, aunque esta situación no fue muy común.

Los síntomas observados en la variedad 'Red Beaut' fueron muy fuertes (hasta intensidad 4), superando incluso los observados en el patrón susceptible 'GF305'. Esta elevada intensidad de síntomas da una idea de la gran susceptibilidad de esta variedad, que por otro lado, fue la primera en la que se detectó el PPV en España (Llacer *y col.*, 1985). Debido a lo apreciado de sus frutos (que no siempre muestran daños), en muchos casos los árboles de esta variedad enfermos de

sharka no son arrancados (Dicenta *y col.*, 1999), sirviendo como verdaderas fuentes de dispersión del virus, tanto en ciruelo como en albaricoquero. En el caso de las variedades 'Golden Japan' y 'Santa Rosa' los síntomas fueron de una menor intensidad (2,33 y 2,5) a los observados en 'Red Beaut', pero al igual que en esta variedad todas las plantas con síntomas dieron positivo en la prueba ELISA. La elevada susceptibilidad encontrada en las tres variedades de ciruelo japonés coincide con la observada en otros trabajos (Cambra *y col.*, 2004).

La variedad 'Ozark Premier' se ha mostrado susceptible, pero debemos destacar la dificultad que presentó la observación visual de síntomas, pues en el primer ciclo sólo una planta mostró síntomas, mientras que el ELISA reveló que tres de ellas estaban infectadas. Las variedades 'Friar', 'Obilnaya', 'Questch' y 'Silvery' también se mostraron susceptibles, y de una manera bastante similar, con pocas plantas evaluadas y síntomas escasos, aunque de las variedades 'Obilnaya' y 'Questch' sólo evaluamos una planta. Cambra *y col.* (2004) obtuvieron un resultado similar en la evaluación de las variedades 'Friar' y 'Ozark Premier'.

Por último, las variedades 'Angeleno', 'Blackamber' y 'President' se han comportado como resistentes, aunque este resultado debemos tomarlo con cautela, pues con una sólo repetición evaluada y con un sólo ciclo no podemos asegurar que sea una evaluación definitiva. La variedad 'Angeleno' ya ha sido caracterizada como resistente con anterioridad (Cambra *y col.*, 2004b), aunque estos mismos autores clasificaron a 'Blackamber' como de susceptibilidad intermedia.

#### 4.4.1.3. Melocotoneros y nectarinas

En la Tabla 4.3 se muestra el comportamiento frente a la sharka de los distintos melocotoneros y nectarinas estudiados. Al igual que en el caso de los albaricoqueros y ciruelos hemos agrupado las variedades en tres grupos según su comportamiento.

- Muy susceptibles: 'Babygold', 'Chato', 'Flordastar', 'Sudanell' y '54P455', aunque en algunos casos no mostraron síntomas de la enfermedad en todos los ciclos.
- Poco susceptibles: es el grupo más amplio, formándolo aquellas variedades que han mostrando pocos síntomas de la enfermedad, en una o muy pocas repeticiones, y de manera muy irregular a lo largo de los cuatro ciclos de evaluación: 'Andross', 'Big Top', 'Bolinha', 'Calabacero', 'Dr Davis', 'Halford', 'Lovell', 'Ross', 'Snowqueen', 'Springcrest' y 'Zincal-5'(Sunred).
- Resistentes: 'Caterina', 'Loadel', 'Marujas', 'Rubidoux' y *P. davidiana*.

En cuanto a la caracterización de los síntomas del PPV en las variedades de melocotonero estudiadas, en general, fueron bastantes similares entre sí, presentando clorosis nerviales de distintas intensidades, en algunos casos se observaron manchas cloróticas en los nervios secundarios y en zonas próximas a los márgenes de las hojas.

Una de las características que hemos podido observar en el comportamiento de los distintos melocotoneros ha sido la escasa sintomatología provocada por la enfermedad, así como la irregularidad de síntomas en cada ciclo. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por diferentes autores que observaron una susceptibilidad generalizada en la especie melocotonero aunque con un nivel de sintomatología menor que la encontrada en albaricoquero o ciruelo (Escalettes *y col.*, 1998; Gabova, 1994; Pascal *y col.*, 2002).

'Baby Gold' se encuentra entre las variedades más susceptibles de las estudiadas. Tres de sus repeticiones presentaron una intensidad intermedia de síntomas y dos de ellas dieron ELISA positivo.

'Andross' mostró síntomas de la enfermedad en el último ciclo de evaluación sólo en una de las repeticiones, siendo su ELISA y RT-PCR positivos. Esto pone de manifiesto que 'Andross' posee una susceptibilidad baja, lo que contrasta con la resistencia observada por Syrgiannidis y Mainou (1986).



**Tabla 4.3.** Evaluación de la resistencia al *Plum pox virus* de distintas variedades de melocotonero. Número de plantas evaluadas (N), número de plantas con síntomas (intensidad media de síntomas), número de plantas ELISA positivo (densidad óptica media). RT-PCR: Negativa o positiva.

Genotipo	N	Ciclo 1		Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4		RT-PCR
		Síntomas	ELISA	Síntomas	Síntomas	Síntomas	ELISA	
Andross	4	0 (0,0)	0 (0,11)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,0)	1 (0,35)	Positiva
Babygold	4	3 (2,0)	2 (0,35)	2 (1,5)	1 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,07)	Negativa
Big Top	5	1 (1,0)	3 (0,59)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,10)	Negativa
Bolinha	3	1 (1,0)	1 (0,40)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,06)	Negativa
Calabacero	2	1 (1,0)	1 (0,55)	0 (0,0)	—	—	—	—
Caterina	6	1 (1,0)	0 (0,07)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,05)	—
Chato	4	3 (2,3)	3 (1,20)	3 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,11)	Negativa
Dr. Davis	5	2 (1,0)	2 (0,63)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,0)	1 (0,19)	Negativa
Flordastar	5	3 (1,0)	4 (0,52)	2 (1,0)	0 (0,0)	—	—	—
Halford	3	1 (1,0)	1 (0,59)	0 (0,0)	1 (1,0)	1 (2,0)	1 (1,20)	Positiva
Loadel	1	0 (0,0)	0 (0,05)	—	—	—	—	—
Lovell	3	1 (2,0)	1 (1,14)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,0)	1 (0,17)	Negativa
Marujas	1	0 (0,0)	0 (0,05)	—	—	—	—	—
Ross	4	0 (0,0)	0 (0,09)	1 (1,0)	1 (1,0)	0 (0,0)	1 (0,18)	Negativa
Rubidoux	3	0 (0,0)	0 (0,05)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,06)	Negativa
Snowqueen	3	0 (0,0)	1 (0,31)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,37)	Negativa
Springcrest	3	0 (0,0)	1 (0,27)	1 (1,0)	—	—	—	—
Sudanell	6	3 (1,3)	2 (0,87)	3 (1,0)	6 (1,3)	0 (0,0)	0 (0,06)	Negativa
Zincal 5	3	0 (0,0)	0 (0,07)	1 (1,0)	0 (0,0)	—	—	—
54P455	5	3 (1,5)	3 (0,71)	0 (0,0)	3 (1,5)	1 (1,0)	1 (0,20)	Positiva
<i>P. davidiana</i>	2	0 (0,0)	0 (0,05)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,08)	—

Intensidad de síntomas entre 0 (ausencia) y 5 (máxima)

Densidad óptica en los controles negativos de 'GF305' entre 0,05 y 0,06

'Bolinha' se comportó de manera similar a 'Andross', pero mostró la susceptibilidad durante el primer ciclo, para después no volver a manifestarla.

Un caso a destacar entre la variedades susceptibles fue 'Big Top', pues durante el primer ciclo de evaluación sólo una planta mostró débiles síntomas de la enfermedad (Figura 4.1), pero al efectuar el ELISA de las diferentes repeticiones, tres de éstas dieron positivo. Esto confirma la necesidad de analizar mediante ELISA aquellas repeticiones que son dudosas, evitándose así posibles errores en la clasificación del material vegetal.

En las variedades 'Springcrest' y 'Snowqueen' se dió una situación parecida a la anterior. Ninguna de las dos variedades mostró síntomas de la enfermedad, pero su posterior ELISA dió positivo, en el ciclo siguiente 'Springcrest' confirmó su susceptibilidad mostrando síntomas de sharka, aunque ligeros. Finalmente 'Snowqueen' durante el cuarto ciclo volvió a no mostrar síntomas y su ELISA fue positivo de nuevo.

Por otro lado, la variedad 'Sudanell' mostró también una cierta tolerancia, pues tras evaluar 8 repeticiones, sólo tres mostraron síntomas de sharka y sólo dos de ellos fueron ELISA positivo.

La variedad 'Caterina' se mostró resistente a la enfermedad. De las seis repeticiones evaluadas sólo una pareció mostrar unos síntomas muy débiles de la enfermedad para posteriormente dar negativo en la prueba ELISA. Posiblemente se trató de un error en la toma de datos.

Otras variedades que han mostrado resistencia han sido 'Loadel' y 'Marujas', aunque tan sólo fuimos capaces de evaluar una planta en un ciclo de cada una de ellas, por lo que deberemos repetir la evaluación.

'Rubidoux' también se ha comportado como resistente, no manifestando la enfermedad y siendo sus respectivos ELISA y RT-PCR negativos a lo largo de toda la evaluación.

Por último, el clon estudiado de la especie *P. davidiana* también fue resistente, contrastando con los resultados obtenidos por Pascal *y col.* (2002), los cuales al estudiar diversos clones de *P. davidiana*, observaron leves síntomas de la enfermedad y ELISA positivo frente a aislados Tipo M, aunque estos desaparecieron en el segundo año de estudio.

En general, las variedades de melocotón mostraron una menor susceptibilidad al aislado Tipo D ensayado que las variedades de albaricoquero y ciruelo, presentando síntomas más débiles de la enfermedad. Estos resultados ponen de manifiesto la menor agresividad de los aislados Tipo D en la especie melocotonero, frente a ciruelo y albaricoquero, lo que ha sido descrito por Quiot *y col.* (1995). Sin embargo, es necesario indicar que el melocotonero es muy susceptible a los aislados Tipo Marcus presentes en otros países europeos, como

Francia, con un nivel de susceptibilidad similar a albaricoquero y ciruelo. Por tanto, en caso de entrada a España de aislados Tipo M las pérdidas en melocotonero podrían ser muy importantes (Asensio y Cambra, 1997).

#### 4.4.1.4. Almendros

La evaluación de las variedades de almendro sobre patrones 'GF305' previamente infectados, tras cuatro ciclos de estudio, nos muestra la resistencia de todas las variedades ensayadas al aislado de PPV utilizado (Tabla 4.4). Ninguna mostró síntomas (Figura 4.1) y todas fueron tanto ELISA como RT-PCR negativas (Figura 4.2) a pesar de los fuertes síntomas observados en los patrones sobre los que fueron evaluadas.

El almendro ha sido descrito como un no hospedante del PPV (Németh, 1994; Kölber, 2001) y así se ha demostrado la resistencia de algunas variedades (Pascal *y col.*, 2002). Sin embargo, la susceptibilidad del almendro a PPV también fue descrita, por Sutic (1965) y Festic (1978). Pribék *y col.* (2001) describieron la presencia de aislados Dideron en almendro. Dallot *y col.* (1997) consiguieron infectar experimentalmente la variedad de almendro 'Ai', mediante injerto y la transmisión por áfidos desde melocotonero 'GF305'. Incluso dirigieron la infección de 'GF305' sanos mediante el uso de pulgones que habían sido alimentados en almendros enfermos. Damsteegt *y col.* (2004) también consiguieron infectar las variedades 'Butte' y 'Mission' de almendro.

El nivel de resistencia encontrado al aislado Tipo D ensayado está de acuerdo con Pascal *y col.* (2002) que observaron la resistencia de las variedades 'Ferragnès', 'Lauranne' y 'Ardechoise' a aislados Tipo M de PPV. Durante dos años, no observaron síntomas ni en hojas ni en flores. Además, ELISA y RT-PCR fueron negativas, excepto la RT-PCR de 'Lauranne'.

Sin embargo, nuestros resultados están parcialmente en desacuerdo con los de Dallot *y col.* (1997), quienes detectaron virus mediante ELISA en la variedad 'Ai', tras la inoculación por injerto con cinco aislados Tipo Dideron, tres Marcus y uno El Amar. A pesar de ello las densidades ópticas encontradas fueron muy bajas,

particularmente en los almendros inoculados con los aislados Dideron. En lo referente a la observación de síntomas, sólo un aislado indujo alguna decoloración clorótica en las hojas de 'Ai', las cuales desaparecían rápidamente. Dallot *y col.* (1997) también demostraron la baja tasa de infección de los aislados Dideron, como previamente habían descrito Quiot *y col.* (1995) en melocotonero. Esto podría explicar la resistencia de las variedades ensayadas al aislado Dideron RB3.30 del estudio.

**Tabla 4.4.** Evaluación de la resistencia al *Plum pox virus* de distintas variedades de almendro. Ninguna variedad mostró síntomas y todas fueron ELISA-negativa. Número de patrones 'GF305' con síntomas (intensidad media de síntomas) RT-PCR: Negativa o positiva.

Variedad	N	Ciclo 1		Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4		
		GF305	Variedad	GF305	GF305	GF305	Variedad	RT-PCR
Almendro		Síntomas	ELISA	Síntomas	Síntomas	Síntomas	ELISA	
Antoñeta	9	9 (3,2)	0,059	9 (2,8)	3 (1,0)	3 (1,0)	0,058	Negativa
Carmel	3	3 (3,6)	0,067	2 (2,0)	3 (2,6)	0 (0,0)	0,060	—
Desmayo	10	4 (4,4)	0,055	5 (2,6)	2 (1,5)	4 (2,2)	0,059	—
Ferragnès	9	3 (1,7)	0,054	4 (1,5)	2 (2,0)	2 (2,0)	0,059	Negativa
Garrigues I	0	0 (0,0)	0,056	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	—	—
Garrigues II	6	6 (1,5)	0,071	1 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,061	Negativa
Guara	10	7 (3,9)	0,058	8 (3,4)	2 (1,0)	5 (1,5)	0,060	Negativa
Lauranne	9	8 (4,1)	0,055	8 (2,6)	4 (1,2)	7 (2,1)	0,058	Negativa
Marcona	7	5 (2,2)	0,060	4 (2,2)	2 (1,0)	4 (1,2)	0,059	Negativa
Marta	9	6 (3,2)	0,060	6 (2,7)	3 (1,7)	4 (1,7)	0,055	Negativa
Mission	4	4 (3,0)	0,100	3 (2,6)	3 (4,0)	2 (3,5)	0,069	—
Ne Plus Ultra	3	3 (3,3)	0,074	2 (2,5)	1 (2,0)	0 (0,0)	0,061	—
Nonpareil	9	4 (3,0)	0,058	3 (2,7)	2 (1,5)	2 (1,0)	0,062	Negativa
Padre	2	2 (1,5)	0,090	2 (3,0)	2 (1,0)	2 (1,0)	0,059	—
Price	1	1 (0,0)	0,081	—	—	—	—	—
Ramillete	9	5 (3,6)	0,056	7 (2,3)	2 (1,0)	3 (1,3)	0,056	Negativa
Sonora	1	0 (0,0)	0,100	1 (3,0)	1 (3,0)	1 (3,0)	0,055	—

Intensidad de síntomas entre 0 (ausencia) y 5 (máxima)

Densidad óptica de los almendros sanos control= 0,060

Densidad óptica del patrón 'GF305' no inoculado= 0,058; 'GF305' inoculado = 2,17

Por otro lado, la única variedad ensayada por Dallot *y col.* (1997), 'Ai', podría representar uno de los pocos casos de susceptibilidad entre las variedades de almendro. Cuando las inoculaciones las realizaron mediante pulgones, los

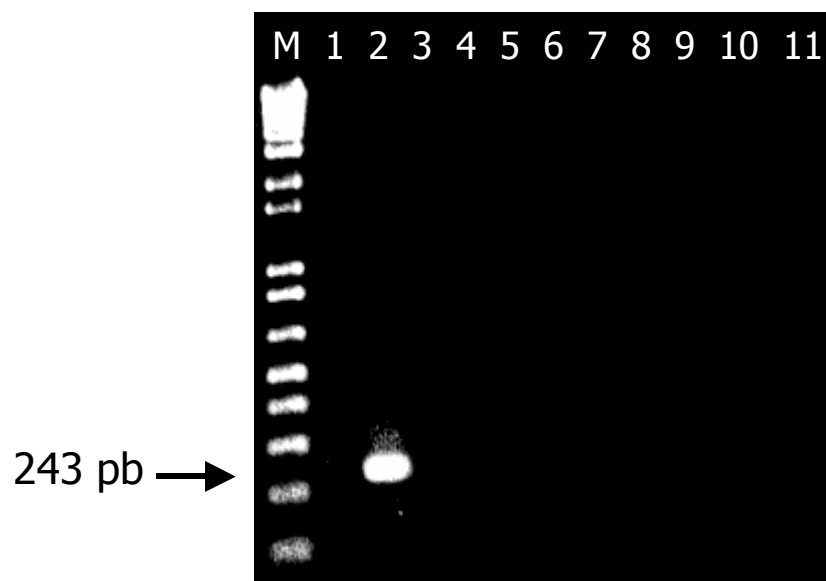
resultados fueron variables. El ELISA fue capaz de detectar PPV en las hojas jóvenes de algunas plantas inoculadas, principalmente con aislados Marcus. A pesar de estos resultados, Dallot *y col.* (1997) no encontraron ningún ELISA-positivo tras el análisis de 356 almendros en campo.

Damsteegt *y col.* (2004) lograron infectar las variedades 'Butte' y 'Mission' (aunque sólo 3 plantas de un total de 20), siendo además sus síntomas muy débiles y transitorios, si bien el ELISA y la RT-PCR confirmaron la presencia del virus.

Estos resultados muestran también el limitado papel que puede jugar el almendro en la dispersión de la sharka, principalmente donde sólo están presentes aislados Tipo D. Este es el caso de los principales países productores de almendra, Estados Unidos y España.

Por otro lado, la evolución de los síntomas en el patrón 'GF305', parece mostrar alguna interacción patrón-variedad. La Tabla 4.4 muestra como el número de patrones con síntomas y la intensidad de estos decrecen a lo largo del ensayo. En el caso de la variedad 'Garrigues', aunque el patrón fue inoculado como en el resto, no observamos síntomas en las hojas del 'GF305'.

Tras el fallo en la inoculación de los patrones sobre los que injertamos la variedad 'Garrigues' (Garrigues-I), decidimos re-injertarla sobre patrones con fuerte presencia de síntomas de la enfermedad (4-5). Después de esta segunda injerta de 'Garrigues' (Garrigues-II), algunos patrones mostraron síntomas en el primer ciclo (6 de 10) y en el segundo (1 de 10) pero no en los siguientes (Tabla 4.4). La escasez de síntomas observada en los patrones sobre los que estaba injertado 'Garrigues' podría indicar la posible interacción entre esta variedad y el patrón, pudiendo inducir la variedad cierta resistencia en el patrón. Esto se confirmó con los resultados de la segunda injerta, con la progresiva reducción y eliminación de los síntomas en el 'GF305' susceptible. Otras causas, tales como el envejecimiento del material vegetal en condiciones controladas u otros factores que escapan a nuestro control, podrían estar implicados.



**Figura 4.2.** Productos de amplificación (243 pb) indicativos de la presencia de PPV. 1. Patrón 'GF305' sano, 2. Patrón 'GF305' infectado, 3. 'Marta', 4. 'Nonpareil', 5. 'Ferragnès', 6. 'Marcona', 7. 'Ramillete', 8. 'Lauranne', 9. 'Guara', 10. 'Antoñeta' y 11. 'Garrigues II'. M. marcador de peso molecular 100 pb (Gibco BRL).

El alto nivel de resistencia observado y la ausencia de barreras para el cruzamiento inicial o los consiguientes retrocruzamientos entre almendro y melocotonero (Gradziel *y col.*, 2001) demuestra la potencialidad de este germoplasma para la mejora de la resistencia a PPV en el melocotonero. Pascal *y col.* (2002) también propusieron el papel que podría jugar el almendro como fuente de resistencia en los programas de mejora del melocotonero, como veremos en el Apartado 5.4.2.

#### 4.4.2. Patrones de frutales del género *Prunus*

El comportamiento de los distintos patrones de *Prunus* evaluados frente a PPV se resume en la Tabla 4.5. En la Figura 4.3 se muestran también los productos de la amplificación (313 pb) mediante RT-PCR, indicando la presencia de PPV en varias muestras.

Después de cuatro ciclos de estudio, varios patrones fueron susceptibles, mostrando síntomas de sharka (confirmada por ELISA-DASI o RT-PCR), aunque el nivel de susceptibilidad fue diferente para cada patrón (Figura 4.4). Siguiendo nuestro criterio de clasificación de la susceptibilidad, los patrones se han comportado como:

- Muy susceptibles: fueron 'GF305', 'Puebla de Soto' y 'Real Fino' que mostraron cuantiosos síntomas a lo largo del estudio. La intensidad de síntomas media de estos genotipos fue elevada (alrededor de 3,0). Además, sus ELISA y RT-PCR fueron positivos, con densidades ópticas situadas entre 1,31 y 2,45. Muchas de las plantas de 'AC 9921-07', 'CP-2', 'Mariana 2624' y 'Nemaguard' también fueron infectadas, manifestando su susceptibilidad frente a PPV, con una intensidad de síntomas de entre 1,9 y 2,9. Los análisis mediante ELISA-DASI y RT-PCR también fueron positivos.
- Poco susceptibles: se situó entre el 22 y el 50% de las repeticiones infectadas de 'Nemared', 'Torinel' y 'STN2,' mostrando una intensidad media de síntomas de 2,5, 1,9, y 1,0 respectivamente, y ELISA-DASI y RT-PCR positivos. El híbrido 'Evrica' y el melocotonero 'Montclar' han mostrado ligeros síntomas de la enfermedad (1,7 y 1,3, de media) y ELISA positivo, pero RT-PCR negativa.
- Resistentes: después de cuatro ciclos de estudio, ninguna planta de 'GF677', 'Myrobolan 29C', 'L2' y 'Pumiselect' mostró síntomas y fueron ELISA-DASI o RT-PCR negativa, por lo que los hemos considerado como resistentes al PPV.

La susceptibilidad encontrada en el patrón 'Puebla de Soto', ampliamente usado como patrón de ciruelo y albaricoquero, que se caracteriza por su facilidad para producir chupones o sierpes (muy frecuentados por áfidos), nos indica el riesgo potencial que puede presentar en la dispersión de la enfermedad al presentar tallos jóvenes de los que se alimentan los pulgones, transmisores de la enfermedad. Kegler *y col.* (1996) indicaron la gran susceptibilidad de los diferentes clones del ciruelo 'Puebla de Soto' a aislados tipo PPV-M.

**Tabla 4.5.** Evaluación de la resistencia al *Plum pox virus* de distintos patrones de *Prunus*. Número de plantas estudiadas (N), número de plantas con síntomas (intensidad media de síntomas), número de plantas ELISA positivo, (densidad óptica media).

Genotipo	N	Ciclo 1		Ciclo 2		Ciclo 3		Ciclo 4		RT-PCR
		Síntomas	ELISA	Síntomas	ELISA	Síntomas	ELISA	Síntomas	ELISA	
AC 9921-07	9	6 (2,0)	6 (1,60)	8 (2,9)	8 (1,68)	7 (2,4)	7 (2,21)	7 (3,0)	7 (1,95)	Positiva
CP-2	12	9 (2,9)	9 (2,23)	6 (2,7)	6 (2,19)	9 (2,2)	8 (2,11)	8 (2,1)	8 (1,87)	Positiva
Evrica	9	5 (1,6)	1 (0,63)	9 (2,1)	1 (1,54)	4 (1,2)	0 (0,06)	0 (0,0)	0 (0,06)	Negativa
GF305	15	14 (3,5)	14 (2,30)	15 (3,0)	—	15 (3,0)	—	15 (3,5)	15 (2,60)	Positiva
GF677	10	0 (0,0)	0 (0,09)	0 (0,0)	0 (0,06)	0 (0,0)	—	0 (0,0)	0 (0,07)	Negativa
L-2	10	0 (0,0)	0 (0,08)	0 (0,0)	0 (0,05)	0 (0,0)	0 (0,05)	0 (0,0)	0 (0,06)	Negativa
Mariana 2624	15	5 (1,8)	5 (0,35)	13 (1,7)	—	14 (1,9)	—	14 (2,1)	13 (1,30)	Positiva
Montclar	10	3 (1,7)	3 (1,47)	4 (2,0)	4 (1,90)	2 (1,5)	3 (1,49)	2 (1,0)	2 (2,88)	Negativa
Myrobolan 29C	15	0 (0,0)	0 (0,05)	0 (0,0)	—	0 (0,0)	—	0 (0,0)	0 (0,06)	Negativa
Nemaguard	10	2 (4,0)	2 (2,19)	5 (2,6)	5 (1,80)	2 (2,0)	2 (2,00)	1 (2,0)	1 (1,41)	Positiva
Nemared	10	4 (2,7)	4 (2,23)	4 (2,7)	4 (2,12)	2 (2,0)	2 (1,81)	2 (2,0)	2 (2,37)	Positiva
Puebla Soto	15	15 (2,6)	11 (0,88)	15 (2,5)	—	15 (3,5)	—	15 (3,1)	15 (1,37)	Positiva
Pumiselect	2	0 (0,0)	0 (0,05)	0 (0,0)	0 (0,06)	—	—	—	—	—
Real Fino	15	12 (2,5)	12 (2,15)	15 (2,9)	—	15 (2,6)	—	14 (2,8)	12 (2,35)	Positiva
STN2	9	0 (0,06)	0 (0,09)	2 (1,5)	2 (2,09)	1 (2,0)	1 (1,25)	2 (1,0)	2 (1,90)	Positiva
Torinel	8	2 (3,5)	2 (2,17)	2 (1,5)	2 (1,27)	1 (1,0)	2 (0,93)	3 (1,6)	3 (0,77)	Positiva

Intensidad de síntomas entre 0 (ausencia) y 5 (máxima)

Densidad óptica de los no inoculados se sitúa entre 0,05 y 0,07

Respecto a la susceptibilidad de 'Real Fino', Martínez-Gómez y Dicenta (2000, 2001) también indicaron la gran susceptibilidad de este albaricoquero al evaluarlo como patrón. En este sentido, Martínez-Gómez y Dicenta (1999) usaron francos de 'Real Fino' como patrón para la evaluación de la resistencia en variedades españolas de albaricoquero.

Respecto a la susceptibilidad observada en las plantas 'AC 9921-07', 'CP-2' y 'Mariana 2624', Dosba *y col.* (1994b) y Kegler (1996) indicaron la gran susceptibilidad de diferentes clones del ciruelo 'Mariana' así como de *P. insititia* a aislados Tipo Marcus. Bodin *y col.* (2003) también observaron la susceptibilidad de diversos clones de 'Mariana' a aislados tipo Cherry (PPV-C). A esto se sumaron



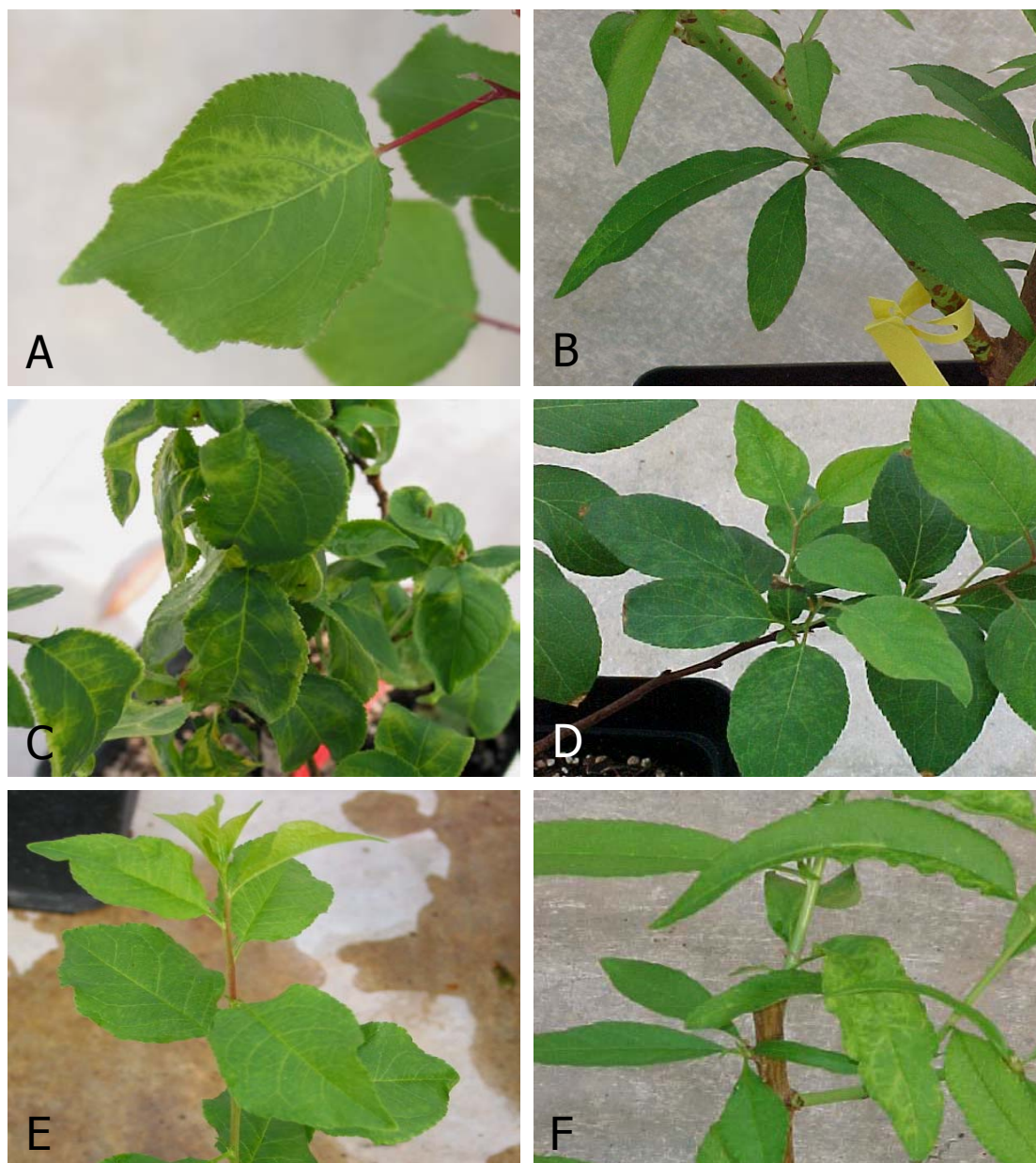
Ferri *y col.* (2002), los cuales utilizaron el clon 'GF8-1' del ciruelo 'Mariana' como modelo de planta susceptible en estudios de dispersión sistémica de la enfermedad.



**Figura 4.3.** Productos de amplificación (313 pb) indicativos de la presencia de PPV, obtenidos usando RT-PCR para la detección de PPV en diferentes muestras. Calle 1. Patrón 'GF305' sano, Calle 2. 'GF305' infectado, Calles 3-11: 3. 'CP-2', 4. 'GF677', 5. 'L-2', 6. 'Myrobolan 29C', 7. 'Nemared', 8. 'Nemaguard', 9. 'Montclar', 10. 'Evrica' y 11. 'Real Fino'. Calle M. marcador de peso molecular 1 Kb (Gibco BRL).

La susceptibilidad observada en 'Nemaguard', descendiente interespecífico de melocotonero x *Prunus davidiana*, está de acuerdo con los resultados observados por Pascal *y col.* (2002) que observaron síntomas en varias líneas de *P. davidiana* infectados con aislados Tipo Marcus.

Normalmente, los patrones que mostraron síntomas fueron ELISA-DASI positivo. En los casos de 'Evrica' y 'Montclar' con densidades ópticas más bajas en sus ELISA-DASI, la RT-PCR fue negativa. A pesar de la sensibilidad superior de la RT-PCR en comparación con el ELISA-DASI (Wetzel *y col.*, 1991a; Martínez-Gómez *y col.* 2003b), la distribución irregular y la baja concentración descrita en los tejidos de *Prunus* (Albrechtova, 1986; Audergon *y col.*, 1989; Martínez-Gómez y Dicenta, 2001) junto con la posible presencia de inhibidores de la PCR en dichos tejidos (Olmos *y col.*, 2002) podría explicar nuestros resultados. En este sentido, Thomidis y Karayiannis (2003) obtuvieron resultados similares usando ELISA y RT-PCR en la detección de PPV en diferentes especies de *Prunus*.



**Figura 4.4.** Síntomas de sharka en diferentes patrones de *Prunus*. A.- Albaricoquero 'Real Fino'. B.- Melocotonero 'Montclar'. C.- Ciruelo 'CP-2'. D.- Ciruelo 'AC9921-07'. E.- Ciruelo 'Evrca'. F.- Melocotonero 'Nemaguard'.

El híbrido interespecífico 'GF677' fue descrito como susceptible a aislados Tipo Dideron por Brenieux *y col.* (1990), aunque nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos por Audergon *y col.* (1995c). Además, ya hemos demostrado la resistencia de diversos cultivares de almendro a un aislado PPV-D, y en el apartado 5.4.3 veremos como el almendro puede transmitir su resistencia al melocotonero.

Por otro lado, Dosba *y col.* (1994a) indicaron la resistencia de distintos clones de *P. cerasifera* a aislados tipo Dideron y Marcus. Sin embargo, Pascal *y col.* (2002) describen una gran susceptibilidad de clones de estas especies a aislados tipo Marcus.

Finalmente, el cerezo ha sido considerada una especie no huésped de aislados Tipo Dideron (Németh, 1994; Kölber, 2001), aunque nuevos aislados (tipos PPV-C) han sido descritos como infectivos en cerezo ácido (Nemchinov *y col.*, 1996a, b) y dulce (Creszenzi *y col.*, 1997).

Además, es importante destacar el diferente nivel de susceptibilidad de los dos genotipos de melocotoneros estudiados ('GF305' y 'Montclar'). Aunque en general, el melocotonero se considera susceptible a PPV (Gabova 1994; Pascal *y col.*, 2002; Martínez-Gómez *y col.*, 2004), Escalettes *y col.* (1998) citan la resistencia de algunos melocotoneros ornamentales. Estos resultados abren la posibilidad de encontrar nuevas fuentes de resistencia a PPV en el melocotonero.

En la Tabla 4.6 mostramos, a modo de resumen, el nivel de resistencia de los 83 genotipos de *Prunus* estudiados. Podemos observar como los genotipos de almendro han sido los únicos que se han mostrado resistentes en su totalidad, mientras que en el resto de especies hay gran diversidad de comportamiento.

Dentro del género *Prunus* observamos una gran variabilidad en el comportamiento frente al aislado Tipo D de PPV ensayado. De los 83 genotipos evaluados, el 55% se comportaron como susceptibles y el 45% restante como resistentes.

**Tabla 4.6.** Resumen del comportamiento frente a la sharka de las variedades y patrones de *Prunus* evaluados.

	<b>Muy susceptibles</b>	<b>Poco susceptibles</b>	<b>Resistentes</b>
Albaricoquero	Canino, Chicano, Dorada, Real Fino	Búlida, Murciana, Rojo Pasión, Veecot	Harlayne, Henderson, Orange Red, Stark Early Orange, Sunglo, Lito, Selene
Ciruelo	Golden Japan, Red Beaut, Santa Rosa	Friar, Ozark Premier, Obilnaya, Questch, Silvery	Angelino, Blackamber, President, J300
Melocotonero	Babygold, Chato, Flordastar, Sudanell, 54P455	Andross, Big Top, Bolinha, Calabacero, Dr Davis, Halford, Lovell, Ross, Snowqueen, Springcrest, Zincal-5	Caterina, Loadel, Marujas, Rubidoux
Almendro			Antoñeta, Carmel, Desmayo, Ferragnès, Garrigues, Guara, Lauranne, Marcona, Marta, Mission, Ne Plus Ultra, Nonpareil, Padre, Price, Ramillete, Sonora
Patrones	AC9921-07, CP-2, GF305, Mariana 2624, Nema-guard, Puebla de Soto, Real Fino	Evrica, Montclar, Nemared, STN2, Torinel	GF677, L-2, Myrobolan 29C, Pumiselect

Esta susceptibilidad al PPV está más extendida en el caso de los ciruelos y los melocotoneros, con el 85% y el 78% de los genotipos evaluados caracterizados como susceptibles. El caso opuesto lo encontramos en los almendros y cerezos, donde todas las variedades evaluadas han sido resistentes. Una situación intermedia la observamos en el albaricoquero, donde encontramos el mismo número de variedades susceptibles y resistentes.

La caracterización del nivel de resistencia en este germoplasma de *Prunus* tan diverso ha sido de gran interés para la identificación de nuevas fuentes de resistencia utilizables en los programas de mejora. Esta información puede ser de gran utilidad para valorar los riesgos potenciales de la sharka para el cultivo de las variedades o patrones más susceptibles al virus.

#### **4.5. CONCLUSIONES**

Se ha confirmado una gran variabilidad de comportamiento de los distintos frutales del género *Prunus* frente al PPV.

En albaricoquero, hemos comprobado la resistencia de las variedades norteamericanas 'Harlayne', 'Henderson', 'Orange Red', 'Stark Early Orange' y 'Sunglo', y de las obtenciones 'Lito' (griega) y 'Selene' (española). Las variedades españolas 'Canino', 'Chicano', 'Dorada' y 'Real Fino' presentaron alta susceptibilidad, mientras que 'Búlida', 'Murciana', 'Rojo Pasión' y 'Veecot' fueron poco susceptibles.

En ciruelo, algunas variedades fueron resistentes ('Angeleno', 'Blackamber', 'President' y 'J300') pero la mayoría fueron susceptibles ('Golden Japan', 'Friar', 'Ozark Premier', 'Obilnaya', 'Questch', 'Red Beaut', 'Santa Rosa' y 'Silvery').

Sólo tres variedades de melocotonero ('Loadel', 'Marujas' y 'Rubidoux') y la especie silvestre *Prunus davidiana* fueron resistentes, siendo la mayoría ('Andross', 'Babygold', 'Big Top', 'Bolinha', 'Calabacero', 'Chato', 'Dr Davis', 'Flordastar', 'Halford', 'Lovell', 'Ross', 'Snowqueen', 'Springcrest', 'Sudanell', 'Zincal-5' y '54P455') susceptibles a la sharka.

Todas las variedades de almendro estudiadas ('Antoñeta', 'Carmel', 'Desmayo', 'Ferragnès', 'Garrigues', 'Guara', 'Lauranne', 'Marcona', 'Marta', 'Mission', 'Ne Plus Ultra', 'Nonpareil', 'Padre', 'Price', 'Ramillete' y 'Sonora') se han mostrado resistentes al aislado del virus estudiado.

Sólo los patrones 'GF677' (almendro x melocotonero), 'L-2' (cerezo), 'Myrobolan 29C' (ciruelo) y 'Pumiselect' (cerezo) se mostraron resistentes al virus. La mayoría de los patrones del grupo de los ciruelos y los melocotoneros ('AC 9921-07', 'CP-2', 'Evrica', 'GF305', 'Mariana 2624', 'Montclar', 'Nemaguard', 'Nemared', 'Puebla Soto', 'Real Fino', 'STN2' y 'Torinel') han mostrado susceptibilidad frente al PPV.

## **5. Transmisión de la resistencia a la sharka en especies del género *Prunus***



## **5. TRANSMISIÓN DE LA RESISTENCIA A LA SHARKA EN ESPECIES FRUTALES DEL GÉNERO *PRUNUS***

### **5.1. INTRODUCCIÓN**

Ante la gravedad y los cuantiosos daños producidos por el PPV en las especies de frutales del género *Prunus*, el cultivo de nuevas variedades resistentes se presenta como la única alternativa de interés para el mantenimiento del cultivo en las zonas afectadas. Por tanto, la resistencia al PPV es uno de los objetivos más importantes de la mejora de estos frutales. Tenemos que recordar, que en estos momentos, la mayoría de las variedades cultivadas de estos frutales son susceptibles y únicamente disponemos de métodos de control preventivo o sanitario basadas en el arranque de los árboles enfermos y el posterior cultivo de plantas certificadas.

Entre las diferentes especies cultivadas del género *Prunus* existe una gran diversidad en cuanto a la resistencia-susceptibilidad al PPV, evidenciada en el Capítulo 4 de esta memoria. Es de destacar la extendida susceptibilidad en las variedades cultivadas en España de especies como el albaricoquero, el ciruelo o el melocotonero. No obstante, también han sido descritas fuentes de resistencia con un gran interés para la mejora en especies como el albaricoquero o en otras especies cultivadas como el almendro, además de en especies silvestres como el *P. davidiana*.

Las posibilidades de transmisión de la resistencia al PPV dentro de las especies del género *Prunus* o entre diferentes especies es uno de los aspectos más importantes a determinar en los programas de mejora de estos frutales. Cuando sea posible, es preferible utilizar fuentes de resistencia dentro de la misma especie, pero cuando no, debemos considerar la utilización de otras especies próximas cultivadas o silvestres.



Hoy en día sabemos que la resistencia puede ser transmitida a la descendencia, pero desconocemos los detalles de esa transmisión, existiendo diversas teorías sobre el posible control genético de la resistencia.

En la herencia de la resistencia a virus fitopatógenos existe, en general, una gran diversidad de comportamientos, dependiendo de las especies y virus implicados (Fraser, 1990). En el caso del *Plum pox virus*, es en ciruelo y albaricoquero donde más se ha estudiado, siendo descrita por algunos autores como un carácter cuantitativo (Kegler *y col.*, 1986; 1989; 1994; Bivol *y col.*, 1987; 1988), describiendo solamente un caso en el que la resistencia es de tipo monogénica, el híbrido 'K4' de ciruelo (reacción de hipersensibilidad) (Kegler y Grüntzig, 1988, 1992; Hartman, 1997).

El albaricoquero es una de las especies en la que se han realizado más estudios sobre la transmisión de la resistencia al PPV. Dosba *y col.* (1987) encontraron que descendientes de distintos cruzamientos entre variedades resistentes y susceptibles segregaban de manera compleja. Posteriormente, Dosba *y col.*, (1991, 1992) sugirieron que el carácter estaría controlado por dos genes siendo la resistencia dominante. Dicenta y Audergon (1998), estudiando una familia descendiente de una polinización libre de la variedad 'Stella', encontraron todos los descendientes resistentes. Ellos sugirieron que la resistencia podría ser dominante y la variedad 'Stella' homocigótica.

Posteriormente, Dicenta *y col.* (2000), estudiando 291 descendientes procedentes de 20 combinaciones entre diferentes genitores susceptibles y resistentes, observaron que sus datos se ajustaban bien a la hipótesis de un carácter controlado por un gen, siendo la resistencia dominante. Badenes *y col.* (2001), Moustafa *y col.* (2001a) y Krska *y col.* (2002), estudiando diferentes cruces de sus programas de mejora, establecieron la hipótesis de dos genes y la resistencia dominante. Sin embargo, Guillet-Bellanger y Audergon (2001), aunque confirmaron la dominancia del alelo de la resistencia, postularon la posibilidad que pudiera haber implicados al menos tres genes. Por otro lado, Badenes *y col.* (1996) sugirieron la posibilidad de que la especie *Prunus mandshurica* sea un antecesor de

las especies resistentes norteamericanas tales como 'Stark Early Orange' o 'Goldrich'.

En cuanto a los estudios moleculares, Hurtado *y col.* (2002) y Vilanova *y col.* (2003), estudiando progenies de albaricoquero, sugirieron que la resistencia a PPV podría estar controlada por dos genes. También identificaron varios microsatélites (SSR, Simple Sequence Repeat) asociados con este carácter, localizando la resistencia a sharka en el grupo de ligamiento 1 del albaricoquero. Más recientemente, Dondini *y col.* (2004), después de un estudio de RGA (Resistance Gene Analogs), también indicaron la naturaleza oligogénica de la resistencia a PPV en especies del género *Prunus*. Abernathy *y col.* (2004) aplicaron microsatélites (SSRs) para estudiar la segregación de los cruzamientos para la resistencia a PPV, y determinaron que 6, 4 y 2 de 8 SSRs, eran polimorficos en los descendientes de 'Vestar' x 'LE-3246', 'Goldrich' x 'Valenciano' y 'Lito' x 'Lito', respectivamente.

Por otro lado, el almendro y el melocotonero son dos especies emparentadas muy próximas, pero adaptadas a dos medios ambientes muy diferenciados: cálido y húmedo para el melocotonero, y más frío y xerófito para el almendro (Watkins, 1976). Gradziel (2003) sugirió el interesante uso del almendro en la mejora del melocotonero para resistencia a PPV. Hasta la fecha no han sido descritas fuentes de resistencia dentro de los melocotoneros cultivados (Gabova, 1994; Pascal *y col.*, 2002). Por el contrario, el almendro ha sido denominado como un no huésped (Kölber, 2001) y ha sido clasificado como resistente por algunos autores (Pascal *y col.*, 2002; Rubio *y col.*, 2003), aunque sin embargo algunos otros han descrito la presencia de aislados Tipo Dideron infectándolos (Dallot *y col.*, 1997; Damsteegt *y col.*, 2004).

Ante este interés por conocer el modo de transmisión de la resistencia a PPV y el desacuerdo sobre como está controlada genéticamente, se hace necesario pues el profundizar sobre el control genético de esta resistencia y su transmisión dentro de una especie o entre diferentes especies. Esta información será de gran interés en los programas de mejora para la obtención eficiente de nuevas variedades resistentes mediante cruzamientos intra e interespecíficos.

## **5.2. MATERIAL ENSAYADO**

El material ensayado en el estudio de la transmisión de la resistencia al PPV en especies del género *Prunus* podemos dividirlo en tres grupos:

a) Un primer grupo formado por la variedad francesa de albaricoquero 'Polonais' (susceptible a PPV), la norteamericana 'Stark Early Orange' (resistente a PPV) (Martínez-Gómez *y col.*, 2000) y los 213 descendientes obtenidos de los cruzamientos 'Polonais' x 'Polonais' (21 descendientes), 'Polonais' x 'Stark Early Orange' (163) y la polinización libre de 'Stark Early Orange' (29). Al disponer en este ensayo de un número suficiente de individuos, pudimos realizar una aproximación al control genético de la resistencia a PPV en albaricoquero, analizando las diferentes hipótesis descritas en el Apartado 5.3.2.

b) Un segundo grupo formado por la variedad de albaricoquero 'Currot', la especie silvestre *P. mandshurica* próxima al albaricoquero, y 12 descendientes del cruzamiento entre ambos. En este estudio decidimos usar la especie *P. mandshurica* por su proximidad a la especie cultivada albaricoquero, además de la resistencia mostrada por el clon de esta especie estudiado en un ensayo anterior realizado por el Dr. Martínez-Gómez (datos no publicados). Por otro lado, Badenes *y col.* (1996) sugirieron que esta especie podría ser la fuente de la resistencia de algunas variedades norteamericanas.

c) Por último se estudió un grupo de 8 selecciones procedentes de cruzamientos entre almendro y melocotonero y viceversa. También fueron evaluados algunos de los genitores. En el caso del melocotonero, al no existir fuentes de resistencia en la especie, y el almendro estar descrito como una especie utilizable en la mejora (Gradziel 2001), decidimos estudiar descendientes del programa norteamericano, comprobando así la transmisión de la resistencia entre especies diferentes como almendro y melocotonero.

En el Apartado 2.1 se muestra una detallada descripción de este material, tanto de los genitores como de los descendientes.

### 5.3. METODOLOGÍA

#### 5.3.1. Evaluación de la resistencia

El proceso de evaluación de la resistencia en condiciones controladas en invernadero se realizó de manera similar a los ensayos anteriores, injertándose entre tres y cinco repeticiones de cada uno de los genitores y los descendientes estudiados, provenientes de cruzamientos intra e interespecíficos, sobre patrones de melocotonero 'GF305' inoculados con el PPV (Apartados 2.3.1 y 3.4.5).

Se determinó el número de descendientes resistentes (ausencia de síntomas y ELISA negativo) y susceptibles (presencia de síntomas y ELISA positivo) para cada una de las familias ensayadas.

#### 5.3.2. Hipótesis de herencia y análisis estadístico

El ratio resistentes/susceptibles obtenido para cada familia de cruzamientos fue contrastado frente a las siguientes hipótesis sobre control genético de la resistencia al PPV:

Hipótesis A: La resistencia a PPV es dominante y está controlada por uno, dos o tres genes.

Hipótesis B: La resistencia a PPV es recesiva y está controlada por uno, dos o tres genes.

Hipótesis C: La resistencia a PPV está controlada por dos genes independientes, en uno la resistencia es recesiva y en el otro es dominante.

Hipótesis D: La resistencia es dominante y está controlada por un gen, pero usando este método de evaluación, un 25% de los descendientes están erróneamente clasificados como resistentes.

Por otro lado, a las frecuencias obtenidas en cada cruzamiento les fue aplicada la prueba estadística de la Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) para comprobar la bondad del ajuste de las distintas hipótesis (Zar, 1999). De entre todas las combinaciones posibles sólo hemos presentado en esta memoria aquellas para las que la probabilidad es  $> 0,05$ .

## 5.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.4.1. Herencia de la resistencia en albaricoquero

Los genitores se comportaron como era de esperar: 'Polonais' como susceptible y 'Stark Early Orange' como resistente. Después de cuatro ciclos de estudio la mayoría de las repeticiones de 'Polonais' mostraron síntomas de sharka y fueron ELISA positivo mientras que las de 'Stark Early Orange' ni mostraron síntomas ni fueron ELISA positivo. No obstante, es necesario destacar que en algunos ciclos de estudio algunas de las repeticiones de 'Polonais' se comportaron como resistentes, incluso en el cuarto ciclo de estudio las tres repeticiones evaluadas se comportaron como resistentes (ausencia de síntomas y ELISA negativo) (Tabla 5.1; Figura 5.1) probablemente debido al estado del material después de cuatro ciclos de cultivo artificial en invernadero.

La evaluación de los descendientes la mostramos en la Tabla 5.1. Al ser un número considerable de descendientes, mostramos una tabla resumen del porcentaje total de resistentes y susceptibles durante los 4 ciclos de estudio.

**Tabla 5.1.** Evaluación de la resistencia al *Plum pox virus* de las variedades de albaricoquero 'Stark Early Orange' (SEO) y 'Polonais', y los descendientes de los cruzamientos entre ellas. Número de descendientes (o repeticiones) evaluados (N), porcentajes de genotipos susceptibles (S) y resistentes (R).

Material evaluado	Ciclo 1			Ciclo 2			Ciclo 3			Ciclo 4		
	N	S	R	N	S	R	N	S	R	N	S	R
<i>Genitores</i>												
<b>SEO</b>	5	0	100	5	0	100	4	0	100	3	0	100
<b>Polonais</b>	3	33	66	2	50	50	3	66	33	3	0	100
<i>Descendencias</i>												
<b>SEO polinización libre</b>	30	13	87	15	20	80	16	19	81	7	0	100
<b>Polonais x SEO</b>	161	37	63	88	8	92	89	6	94	24	8	92
<b>Polonais x Polonais</b>	18	56	44	5	80	20	4	25	75	5	40	60

En este ensayo, después de cada ciclo, los descendientes susceptibles fueron eliminados de la evaluación.

El comportamiento global de los 213 descendientes evaluados después de cuatro ciclos fue: 82 (38,5%) susceptibles a PPV y 131 (61,5%) fueron resistentes. Dentro de cada familia los ratios resistentes/susceptibles en términos porcentuales fueron 28:72 en 'Polonais' x 'Polonais', 62:38 en 'Polonais' x 'Stark Early Orange' y 83:17 en la polinización libre de 'Stark Early Orange'. Si bien es necesario destacar que los datos sobre el ratio resistentes:susceptibles variaron durante los diferentes ciclos de estudio, con una tendencia a aumentar el ratio de los individuos resistentes (ausencia de síntomas y ELISA negativo) conforme avanzan los ciclos de estudio, probablemente debido al estado del material después de cuatro ciclos de cultivo forzado en invernadero.

Estas proporciones, a priori, no se ajustan a ninguna de las diferentes hipótesis descritas hasta la fecha sobre el control genético de la resistencia a PPV en albaricoquero (Tabla 5.2).



**Figura 5.1:** Detalle de dos de los descendientes evaluados del cruzamiento 'Polonais' x 'Stark Early Orange'. Podemos observar los fuertes síntomas de PPV mostrados por uno de los descendientes evaluados (izquierda) en comparación con el otro descendiente que mostró resistencia al virus (derecha).

En primer lugar, es necesario destacar que el progenitor resistente es capaz de transmitir su resistencia a su descendencia como previamente ha sido observado por otros autores (Dosba *y col.*, 1992; Dicenta y Audergon, 1998). En trabajos recientes, estudiando descendientes de cruzamientos de albaricoquero con diferentes niveles de susceptibilidad, Amenduni *y col.* (2004) obtuvieron ratios de susceptibilidad elevadísimos (90%) con el aislado Tipo Marcus ensayado. Destacando sobre todo el cruzamiento 'Portici' (susceptible) x 'Stark Early Orange' (resistente) del que tan sólo 1 descendiente de los 108 evaluados se comportó como resistente.

Por otro lado, todas las hipótesis sobre el control de la resistencia descritas en albaricoquero consideran la resistencia como dominante (Hipótesis A). Si consideramos el carácter como monogénico (Dicenta *y col.*, 2000), solamente una de las familias (polinización libre de 'Stark Early Orange') se ajusta a dicha hipótesis. Cuando se consideran dos genes (Dosba *y col.*, 1991; Badenes *y col.*, 2001; Moustafa *y col.*, 2001a; Krska *y col.*, 2002) o tres genes (Guiellet-Bellanger y Audergon, 2001), en ninguno de los casos se produce un buen ajuste.

La única familia que se ajusta ( $p= 0,334$ ) a la Hipótesis A (un gen y resistencia dominante) es la polinización libre de 'Stark Early Orange', siendo heterocigótico (Aa) en un hipotético cruce con un número similar de genotipos AA, Aa y aa. La clasificación de 'Stark Early Orange' como heterocigótico resistente, está de acuerdo con el resultado obtenido de 'Polonais' x 'Stark Early Orange' donde se obtuvieron descendientes resistentes y susceptibles.

De acuerdo con esta hipótesis, estudios moleculares han identificado un QTL relacionado con la resistencia a PPV en albaricoquero ligado al grupo de ligamiento 1 (Hurtado *y col.*, 2002; Vilanova *y col.*, 2003). Estos autores también han señalado la posibilidad de otros QTLs relacionados con la resistencia del albaricoquero localizados en otros grupos de ligamiento. En este sentido, Decroocq *y col.* (2005) describen en *Prunus davidiana* un QTL responsable de la resistencia a PPV, localizado también en la región distal del grupo de ligamiento 1, así como en una región en la que la resistencia fue previamente identificada en albaricoquero (Hurtado *y col.*, 2002; Vilanova *y col.*, 2003). Sin embargo, Decroocq *y col.* (2005)

también detectaron otras cinco regiones genómicas responsables de la resistencia a PPV en *P. davidiana*, lo que indicaría una transmisión oligogénica de la resistencia, con más de un gen implicado.

Considerando la Hipótesis B (la resistencia es recesiva) y un sólo gen implicado, solamente 'Polonais' x 'Polonais' ( $Aa$ ) se ajusta a esta hipótesis ( $p= 0,705$ ). En el caso de dos genes, 'Polonais' x 'Polonais' ( $AaBb$  x  $AaBb$ ) ( $p= 0,161$ ) y 'Polonais' x 'Stark Early Orange' ( $AaBb$  x  $Aabb$ ) ( $p= 0,887$ ) se ajustarían a la segregación esperada. Si hubiera tres genes implicados, 'Polonais' x 'Polonais' (siendo 'Polonais' =  $AABbCc$  o  $AABBcc$ ) se ajustaría ( $p= 0,161$  o  $p= 0,705$ , respectivamente) a las frecuencias esperadas.

La hipótesis de la herencia recesiva de la resistencia ha sido descrita en plantas herbáceas infectadas con otros *Potyvirus* (Providenti y Hampton 1992; Revers *y col.*, 1999; Ruffel *y col.* 2002; Gao *y col.*, 2004) aunque hasta la fecha no ha sido descrita para el caso del PPV. Además, Díaz-Pendon *y col.* (2004) consideran la resistencia recesiva en los *potyvirus* como relativamente común.

Considerando la Hipótesis C, obtenemos un buen ajuste para las tres familias: 'Polonais' x 'Polonais' ( $Aabb$  x  $Aabb$ ) ( $p= 0,705$ ), 'Polonais' x 'Stark Early Orange' ( $Aabb$  x  $AaBb$ ) ( $p= 0,887$ ) y la polinización libre de 'Stark Early Orange' ( $AaBb$  x  $AaBb$ ) ( $p= 0,840$ ).

Finalmente, la Hipótesis D, considera que mediante el método de evaluación utilizado no conseguimos infectar un 25% de las plantas susceptibles, clasificándolas como resistentes. Esta hipotética situación puede ser muy real, debido a factores no controlados, como hemos puesto de manifiesto en los Apartados 3.4.4 y 3.4.5. El comportamiento de algunos genotipos (incluso la misma planta) no es homogéneo a lo largo de los cuatro ciclos. Frecuentemente algunos genotipos clasificados como resistentes en los primeros ciclos se muestran susceptibles posteriormente. Aceptando esta posibilidad, y considerando la resistencia monogénica y dominante, obtenemos un buen ajuste para los cruzamientos de las tres familias: 'Polonais' x 'Polonais' ( $aa$  x  $aa$ ) ( $p= 0,705$ ), 'Polonais' x 'Stark Early Orange' ( $aa$  x  $Aa$ ) ( $p= 0,887$ ) y la polinización libre de 'Stark Early Orange' ( $Aa$  x  $Aa$ ) ( $p= 0,840$ ).



**Tabla 5.2.** Transmisión de la resistencia en tres familias de albaricoquero. Chi-cuadrado entre los valores observados y los esperados. N= número de descendientes evaluados. R:S= porcentaje resistentes-susceptibles. Valores para cuatro hipótesis (H) de control genético. De entre todas las combinaciones posibles estudiadas, solamente se muestran las combinaciones significativas ( $p > 0,05$ ).

Familia	N	Observados R:S (%)	H <sup>1</sup>	N genes	Genotipos hipotéticos	Esperados R:S (%)	Chi-cuadrado ( $\chi^2$ )	Probabilidad (p)
SEO polinización libre	29	83:17	A	1	Aa x Aa	75:25	0,93	0,334
			C	2	AaBb x AaBb	81,2:18,8	0,04	0,840
			D	1	Aa x Aa	81,2:18,8	0,04	0,840
Polonais x SEO	163	62:38	B	2	AaBb x Aabb	62,5:37,5	0,02	0,887
			C	2	Aabb x AaBb	62,5:37,5	0,02	0,887
			D	1	Aa x Aa	62,5:37,5	0,02	0,887
Polonaisx Polonais	21	28:72	B	1	Aa x Aa	25:75	0,14	0,705
				2	AaBb x AaBb	56,2:43,8	1,96	0,161
				3	AABbCc x AABbCc	56,2:43,8	1,96	0,161
				3	AABbCc x AABbCc	25:75	0,14	0,705
			C	2	Aabb x Aabb	25:75	0,14	0,705
			D	1	Aa x aa	25:75	0,14	0,705

<sup>1</sup>Hipótesis A: resistencia dominante y controlada por uno, dos ó tres genes.

Hipótesis B: resistencia recesiva y controlada por uno, dos ó tres genes.

Hipótesis C: resistencia controlada por dos genes independientes, en uno la resistencia es recesiva, y en el otro es dominante.

Hipótesis D: resistencia dominante y controlada por un gen aunque, usando el actual test de evaluación, el 25% de los descendientes susceptibles están erróneamente clasificados como resistentes.

Como conclusión podemos indicar que el análisis de nuestros resultados muestra la dificultad de establecer una hipótesis definitiva sobre el control genético de la resistencia a PPV en albaricoquero. Sin embargo, las Hipótesis C (2 genes) y D (1 gen), se ajustan para las tres familias. La Hipótesis D (resistencia dominante y monogénica con un 25% de error en el test de evaluación) es la que mejor se ajusta a los valores observados para las tres familias estudiadas. Sobre la hipótesis C, aunque se ajusta para las tres familias, pensamos que es complicada su interpretación.

Los contradictorios resultados obtenidos por diferentes autores (Audergon *y col.*, 1995a; Martínez-Gómez *y col.*, 1999, 2000; Moustafa *y col.*, 2001a; Hurtado *y col.*, 2002) en lo referente a la herencia de la resistencia a PPV en albaricoquero podrían ser consecuencia de muchos factores que afectan a la evaluación, incluyendo la autenticidad de los genotipos estudiados (variedades y descendencias) o el método aplicado.

En este sentido, el aislado de PPV, el método de inoculación, el ambiente y las condiciones de cultivo, o la definición del carácter no han sido los mismos en todos los trabajos sobre el control genético de la resistencia. Además, la susceptibilidad de un cultivar dado por diferentes autores puede ser distinta frente a aislados Tipo Marcus y Dideron en función de la diferente agresividad de estos aislados descrita por diferentes autores (Quiot *y col.*, 1995; Rankovic *y col.*, 1999). Incluso puede haber diferencias en cuanto a la clasificación del comportamiento de un mismo genotipo frente al mismo aislado (Martínez-Gómez *y col.*, 2000).

Al igual que Hurtado *y col.* (2002) hemos podido observar que un número de descendientes clasificados como resistentes en el primer ciclo se muestran susceptibles en ciclos sucesivos al aumentar el tiempo de exposición del material vegetal a la infección por el virus. Por otro lado, el deterioro del material vegetal, después de varios ciclos de cultivo forzado, puede hacer que plantas que mostraban síntomas en los primeros ciclos de evaluación dejen de mostrarlos en sucesivos ciclos. Este comportamiento podría contribuir a los errores cometidos en

el proceso de evaluación, como sugerimos en la Hipótesis D, justificando este modelo.

Por esta razón, pensamos que los diferentes grupos de investigación implicados en estos estudios sobre la transmisión y herencia de la resistencia al PPV en especies del género *Prunus* deberían usar métodos similares de evaluación del carácter, garantizando también la autenticidad del material vegetal y de los aislados del virus, para poder comparar los resultados obtenidos sobre control de la resistencia al PPV y así unificar criterios. También tenemos que destacar que las nuevas metodologías de estudio a nivel molecular deben de ser incorporadas en los estudios de transmisión de este carácter al objeto de clarificar los resultados observados mediante la evaluación del comportamiento frente al PPV del material vegetal.

#### **5.4.2. *Prunus mandshurica* como fuente de resistencia en albaricoquero**

Los resultados de la evaluación han mostrado la susceptibilidad de ambos genitores. En el caso de la variedad 'Currot' estos síntomas se mostraron durante el primer ciclo, en cambio *P. mandshurica* no lo hizo hasta el segundo. Todos los descendientes fueron susceptibles al PPV, mostrando fuertes síntomas de la enfermedad, siendo su ELISA-DASI positivo. En general, en ambos genitores hemos podido observar una intensidad de síntomas muy baja en comparación con la experimentada por sus descendientes (Tabla 5.3).

En algunos descendientes (5, 6, 10, 11 y 12) la intensidad de síntomas en los ciclos 2 y 3 fue muy alta, llegando a una intensidad media de 4,5 (Tabla 5.3; Figura 5.2), cifra muy elevada si la comparamos con las intensidades medias que suelen mostrar los descendientes y variedades de albaricoquero evaluados en los distintos programas de mejora (1-3) (Martínez-Gómez *y col.*, 2000). Además, la mayoría de los descendientes tuvieron una intensidad de síntomas mayor en el segundo y tercer ciclo que en el primero. Durante el cuarto ciclo se observa un descenso de la intensidad de síntomas, probablemente debido al envejecimiento de las plantas cultivadas en macetas.

**Tabla 5.3.** Evaluación de la resistencia al *Plum pox virus* de 12 descendientes de *P. mandshurica* x 'Currot' y de sus genitores. Número de plantas evaluadas, con síntomas (intensidad media) y número de plantas ELISA positivo (densidad óptica media).

Genotipos	N	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4	
		Síntomas <sup>1</sup>	Síntomas <sup>1</sup>	Síntomas <sup>1</sup>	Síntomas <sup>1</sup>	ELISA+ <sup>2</sup>
<i>Genitores</i>						
<i>P. mandshurica</i>	2	0 (0,0)	2 (1,0)	0 (0,0)	1 (2,0)	1 (1,34)
Currot*	3	—	—	2 (1,0)	3 (1,2)	3 (1,05)
<i>Descendencias</i>						
1*	3	—	—	3 (2,3)	3 (1,6)	3 (1,85)
2*	3	—	—	2 (1,6)	3 (1,0)	3 (2,55)
3*	1	—	—	1 (3,0)	1 (2,0)	1 (2,09)
4*	1	—	—	1 (2,0)	1 (1,0)	1 (0,81)
5	2	2 (3,5)	2 (4,5)	2 (3,0)	2 (1,5)	2 (1,78)
6	2	2 (3,0)	2 (4,0)	2 (2,5)	2 (1,5)	2 (2,40)
7	3	3 (1,6)	3 (3,3)	3 (3,0)	3 (1,3)	3 (2,40)
8	2	2 (2,5)	2 (2,5)	2 (2,5)	2 (2,0)	2 (2,45)
9	3	3 (1,5)	3 (3,0)	3 (1,6)	2 (0,5)	1 (1,41)
10	1	1 (2,0)	1 (3,0)	1 (4,0)	1 (2,0)	1 (1,99)
11	2	2 (3,0)	2 (3,0)	2 (4,0)	2 (1,5)	2 (1,29)
12	2	2 (2,0)	2 (3,5)	2 (4,0)	2 (1,5)	2 (1,77)
<i>Media descendientes</i>		<i>2,1 (2,4)</i>	<i>2,1 (3,2)</i>	<i>2,0 (2,8)</i>	<i>2,0 (1,5)</i>	<i>1,9 (1,90)</i>

<sup>1</sup> Intensidad de síntomas evaluados desde 0 (ausencia) hasta 5 (máxima intensidad).

<sup>2</sup> Densidad óptica media del ELISA a 405 nm tras 60 minutos.

\* En estos genotipos, los ciclos 3 y 4 corresponden a los ciclos 1 y 2 respectivamente, ya que fueron injertados un año (dos ciclos) después que el resto de descendientes.

Hasta la fecha, el comportamiento de *P. mandshurica* frente a la sharka no estaba claro. Sin embargo, Badenes *y col.* (1996) después de un estudio isoenzimático sugirieron que la resistencia de las variedades norteamericanas de albaricoquero como 'Stark Early Orange' o 'Goldrich' podría estar relacionada con esta especie. Los resultados obtenidos nos muestran que *P. mandshurica*, al menos el clon estudiado, no es un buen genitor para resistencia a la sharka, y probablemente la especie *P. mandshurica* no sea una fuente de resistencia a PPV.



**Figura 5.2:** Detalle de dos de los descendientes del cruzamiento *P. mandshurica* x 'Currot' (*Prunus armeniaca* L.) mostrando fuertes síntomas de PPV.

Estos resultados descartarían también en principio nuestra Hipótesis B (Apartado 5.4.1) sobre control de la herencia (la resistencia a PPV es recesiva y esta controlada por uno, dos o tres genes) ya que en ninguno de los descendientes del cruzamiento de estos materiales susceptibles se observa un comportamiento resistente. En esta misma línea Dicenta *y col.* (2000) indicaron que en la evaluación de descendencias entre cruzamientos de variedades susceptibles en ningún caso se observó un comportamiento resistente de ningún descendiente.

### **5.4.3. El almendro como fuente de resistencia en el melocotonero**

En la Tabla 5.4 podemos encontrar los resultados de la evaluación de los descendientes interespecíficos melocotonero-almendro así como de algunos de los genitores.

En el caso de la evaluación de los genitores, de acuerdo a los resultados descritos en el Apartado 4.4.1.4, los genotipos de almendro (variedades 'Nonpareil' y 'Padre') se mostraron resistentes al PPV frente a la susceptibilidad mostrada por los genotipos de melocotonero ('54P455' y 'Nemaguard').

Por otro lado, sólo las líneas de mejora de melocotonero procedentes de cruzamientos interespecíficos '99,15-154' y 'F8,5-166' mostraron síntomas de la enfermedad (Figura 5.3). Además, en el caso de 'F8,5-166', tan sólo una de las cinco repeticiones estudiadas se mostró susceptible en el segundo ciclo, dando en un ciclo posterior la RT-PCR negativa. El resto de genotipos ni mostraron síntomas de sharka, ni fueron ELISA y RT-PCR positivos.

Los resultados obtenidos nos muestran la fácil transmisión de la resistencia entre dos especies diferentes como almendro y melocotonero, 6 de los 8 genotipos procedentes de cruzamientos interespecíficos entre estas especies fueron resistentes al PPV. Esta fácil transmisión ha sido descrita por diferentes autores dentro de la especie albaricoquero (Dosba *y col.*, 1991; Dicenta *y col.*, 2000; Badenes *y col.*, 2001; Guiellet-Bellanger y Audergon, 2001; Moustafa *y col.*, 2001a; Krska *y col.*, 2002), tal como ha sido observada en los cruzamientos intraespecíficos de albaricoquero evaluados en esta Tesis (Apartado 5.4.1).

Aunque no se presenta la caracterización pomológica de estas selecciones, los materiales más parecidos al melocotonero fueron más susceptibles al PPV.

**Tabla 5.4.** Evaluación de la resistencia al *Plum pox virus* de los descendientes de cruzamientos interespecíficos almendro x melocotonero, melocotonero x almendro, y algunos de sus progenitores. Número de plantas evaluadas (N), con síntomas (intensidad media) y número de plantas ELISA positivo (densidad óptica media). RT-PCR: Negativa o positiva.

Genotipo	Pedigrí	N	Ciclo 1		Ciclo 2		Ciclo 3		Ciclo 4		
			Síntomas <sup>1</sup>	ELISA <sup>2</sup>	Síntomas <sup>1</sup>	Síntomas <sup>1</sup>	Síntomas <sup>1</sup>	ELISA <sup>2</sup>	Síntomas <sup>1</sup>	ELISA <sup>2</sup>	RT-PCR
<i>Genitores</i>											
Nonpareil	Almendro de origen desconocido	2	0 (0,0)	0 (0,10)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,07)	Negativa
Padre	Almendro (Misión x Swanson)	2	0 (0,0)	0 (0,09)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,06)	Negativa
54P455	Selección de melocotonero	4	3 (1,5)	3 (0,71)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (1,5)	1 (1,0)	1 (0,20)		Positiva
Nemaguard	Selección de melocotonero	2	2 (2,5)	2 (1,89)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,06)		---
<i>Descendencias</i>											
99,15-154	(Melocotonero x Nonpareil) BC <sub>2</sub>	3	1 (2,0)	1 (1,68)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (1,0)	1 (1,0)	1 (0,27)		Positiva
F8,5-156	(Melocotonero x F10C,12-28) F <sub>2</sub>	2	0 (0,0)	0 (0,06)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,06)		Negativa
F8,5-166	(Melocotonero x F10C,12-28) F <sub>2</sub>	5	0 (0,0)	0 (0,10)	1 (2,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,05)		Negativa
F10C,12-28	(Padre x 54P455) F <sub>2</sub>	4	0 (0,0)	0 (0,08)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,06)		Negativa
F10C,20-51	(Padre x 54P455) F <sub>2</sub>	3	0 (0,0)	0 (0,08)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,06)		Negativa
F10D,7-22	Padre x 54P455	1	0 (0,0)	0 (0,07)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,07)		Negativa
Hansen 536	Almendro x Melocotonero	3	0 (0,0)	0 (0,06)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,06)		Negativa
Nickels	Almendro x Nemaguard	3	0 (0,0)	0 (0,06)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,06)		Negativa

<sup>1</sup> Intensidad de síntomas evaluados desde 0 (ausencia) hasta 5 (máxima intensidad).

<sup>2</sup> Densidad óptica media del ELISA a 405 nm tras 60 minutos.



**Figura 5.3:** Detalle de dos de los descendientes de cruzamientos entre melocotonero y almendro evaluados. Podemos observar la resistencia (ausencia de síntomas) de las dos líneas de mejora 'F10C, 12-28' (izquierda) y 'F8,5-156' (derecha) injertadas sobre 'GF305', el cual si presenta fuertes síntomas de la enfermedad.

Estos resultados confirmarían también nuestra Hipótesis A sobre control de la herencia (la resistencia a PPV es dominante y está controlada por uno, dos o tres genes) en albaricoquero (Apartado 5.4.1) ya que en la mayoría de los descendientes del cruzamiento interespecífico entre almendro y melocotonero se observa un comportamiento resistente frente al PPV.

Finalmente, los resultados obtenidos también nos muestran la posibilidad de usar el almendro (evaluado en esta Tesis como especie resistente al PPV, Apartado 4.4.1.4) como donante de resistencia para la mejora del melocotonero (especie en la que hemos descrito un mayoritario comportamiento susceptible a los aislados Tipo D de PPV, Apartado 4.4.1.3), pues la mayoría de los genotipos procedentes de cruzamientos interespecíficos entre estas especies fueron resistentes al PPV. Así, la ausencia de barreras interespecíficas en los cruzamientos iniciales o en los posteriores retrocruzamientos entre almendro y melocotonero (Gradziel, 2003), confirma la conveniencia de usar el germoplasma del almendro en la mejora del melocotonero para resistencia a PPV.



## **5.5. CONCLUSIONES**

La resistencia a la sharka puede ser transmitida mediante cruzamientos intra o interespecíficos posibilitando, en los programas de mejora de *Prunus*, la utilización de fuentes de resistencia dentro de una especie o entre especies diferentes.

Entre las hipótesis propuestas del control genético de la resistencia a PPV en albaricoquero, las que mejor se ajustan son la hipótesis C (la resistencia está controlada por dos genes independientes, en uno la resistencia es recesiva y en el otro es dominante) y la Hipótesis D (la resistencia es dominante, controlada por un gen, aunque el 25% de plantas susceptibles escapan a la infección).

La utilización de *Prunus mandshurica* como fuente de resistencia en albaricoquero no es eficaz ya que, además de ser susceptible, transmite esta característica a la descendencia.

La transmisión de la resistencia a la sharka desde el almendro al melocotonero ha sido efectiva, lo que abre nuevas posibilidades en la mejora del melocotonero para resistencia.

## **6. Resumen y conclusiones generales**



## 6. RESUMEN Y CONCLUSIONES GENERALES

El cultivo de frutales del género *Prunus* es de gran importancia en términos económicos tanto a nivel nacional como a nivel regional en Murcia. La aparición del virus de la sharka (*Plum pox virus*, PPV) a mediados de los años ochenta ha hecho que en estos momentos en muchas áreas la producción se vea seriamente afectada, poniendo incluso en peligro la continuidad del cultivo de estos frutales. Por este motivo la obtención de nuevas variedades resistentes es de gran importancia en los programas de mejora genética de estas especies. En estos programas de mejora la correcta evaluación del comportamiento frente al PPV es uno de los aspectos claves.

En cuanto a la evaluación del comportamiento frente al PPV, los ensayos realizados ponen de manifiesto que, de las diferentes técnicas de detección estudiadas, la técnica serológica ELISA-DASI es un método fiable para la detección del PPV con un menor coste por muestra y una menor inversión en equipo, muy aplicable a la rutina de los programas de mejora. Sin embargo, esta técnica presenta una menor sensibilidad de detección frente a la técnica molecular RT-PCR que se ha manifestado como una técnica complementaria al ELISA-DASI para la aplicación en los casos de confirmación de la resistencia al PPV. Además, los estudios de localización del virus en los tejidos han puesto de manifiesto que el virus no es capaz de pasar a través de las plantas resistentes, pudiendo ser esta oposición (resistencia) al movimiento del virus a larga distancia, por los vasos conductores de las variedades a evaluar, una metodología alternativa en la evaluación de la resistencia a PPV. De esta manera evaluaríamos los síntomas sobre la planta indicadora, independientemente del genotipo a estudiar.

Por otro lado, la evaluación de la resistencia en condiciones controladas en invernadero es un método válido, debiendo mejorarse algunos aspectos para que sea comparable con la evaluación en condiciones de campo. Para la optimización de esta evaluación en invernadero debemos inocular en primer lugar los patrones

('GF305' o 'Real Fino'), sobre éstos injertaremos al menos dos yemas del material a evaluar, asegurándonos así un mayor porcentaje de planta evaluada correctamente y descartando la inoculación sobre los injertos brotados. La injerta debe realizarse en primavera, teniendo en cuenta que será sometida a letargo artificial.

La evaluación del comportamiento de los diversos materiales del género *Prunus* frente al aislado Tipo D de PPV estudiado ha puesto de manifiesto el amplio rango de comportamientos existentes. Entre los melocotoneros y nectarinas existe una susceptibilidad generalizada, mientras que en albaricoqueros y ciruelos podemos encontrar fuentes de resistencia dentro de la gran cantidad de variedades susceptibles. En cambio, en nuestras condiciones experimentales, el almendro se ha comportado como resistente. Finalmente, los patrones de *Prunus* han seguido la tónica del género, con variedad de comportamientos, aunque en algunos casos la susceptibilidad ha sido muy elevada, superando incluso a las plantas indicadoras.

La resistencia al virus de la sharka puede ser transmitida de padres a hijos, mediante cruzamientos intra o interespecíficos. Así, dentro de los programas de mejora de *Prunus* se pueden buscar y utilizar fuentes de resistencia al virus dentro de la misma especie o en especies próximas. Respecto al control genético de la enfermedad, no hemos podido establecer una hipótesis que valide un modelo concreto de herencia. En la actualidad existen demasiados parámetros que escapan a nuestro control, y la diversidad de hipótesis postuladas hacen que realmente no conozcamos el mecanismo genético que controla la resistencia. La solución a estos problemas podría abordarse aunando esfuerzos entre equipos de investigación, usando idéntico material vegetal, aislados y modelos de evaluación, para de esta manera poder comprobar, en igualdad de condiciones, el comportamiento de las diferentes especies frente al virus.

Finalmente, la utilización de la especie *Prunus mandshurica* queda descartada para la mejora de la especie albaricoquero, pues tras su evaluación, ésta se ha mostrado como susceptible a la enfermedad, transmitiendo este carácter a la descendencia. Sin embargo, la especie almendro se ha comportando como una buena fuente de resistencia al PPV para el melocotonero.

## **7. Bibliografía**



## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abernathy D, Zhebentyayeva T, Abbott AG, Vilanova S, Badenes ML, Salava J, Polák J, Krska B, Damsteegt VD.** 2004. Molecular genetic mapping of the *Plum pox virus* resistance genes in apricot. *Acta Horticulturae* **657**. 283-288.
- Acuña R.** 1993. Outbreaks of *Plum pox virus* in Chile. *Book of abstracts of the Conference on Plum Pox*. Burdeos, Octubre de 1993. 77.
- Adamolle C, Boeglin M, Labonne G, Candresse T, Quiot JB.** 1994. Une souche nécrogène du *Plum pox potyvirus* provoque un dépérissement sur certains cultivars de pêcher. *Bulletin EPPO* **24**:3. 721-730.
- Adams AN.** 1978. The detection of *Plum pox virus* in *Prunus* species by enzyme-linked immunosorbent assay ELISA. *Annals of Applied Biology* **90**. 215-221.
- Adams AN, Guise CM, Crossley SJ.** 1999. *Plum pox virus* detection in dormant plum trees by PCR and ELISA. *Plant Pathology* **48**. 240-244.
- Albrechtova L.** 1986. Investigations on the distribution of sharka virus (*Plum pox*) in tissue of *Prunus domestica*. *Z. Pflanzenkr Pflanzenschutz* **93**. 190-201.
- Albrechtova L.** 1990. Determination of *Plum pox virus* in the tissues of peach trees by ELISA during vegetation period. *Zahradnictvi* **17**. 251-262.
- Amenduni T, Bazzoni A, Minafra A, Savino V.** 2004. Evaluation of the susceptibility of seedlings from apricot crosses to the Marcus strain of *Plum pox virus*. *Acta Horticulturae* **657**. 305-308.
- Asensio M.** 1996. El virus de la sharka (*Plum pox virus*). Caracterización, diagnóstico y detección mediante anticuerpos monoclonales específicos. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Asensio M, Cambra M.** 1997. Aislados agresivos "Marcus" (M) del virus de la sharka un peligro para la fruticultura española. *Fruticultura Profesional* **87**. 59-67.
- Atanassoff D.** 1932. Plum Pox. A new virus disease. Yearbook University of Sofia. Faculty of Agriculture and Sylviculture **11**. 46-49.
- Audergon JM, Monestiez P, Labonne G, Quiot JB.** 1989. Virus de la sharka. Repartition spatiale du virus dans un arbre. *2 Rencontres de Virologie Végétale*. Aussois, Enero de 1989. 13.
- Audergon JM, Morvan G.** 1990. A rapid method for assessing the sensitivity of apricot to *Plum pox virus*. *XXIII International Horticultural Congress*. Firenze. 46.
- Audergon JM, Duffillol JM, Gilles F, Signoret V, Broquaire JM, Fournie JL, Minodier R, Pinet C.** 1991. L'abricot. Quelles variétés pour demain?. *L'Arboriculture Fruitière* **437**. 34-46.
- Audergon JM, Dosba F, Karayiannis I, Dicenta F.** 1994. Amélioration de l'abricotier pour la résistance à la sharka. *Bulletin EPPO* **24**:3. 741-748.



- Audergon JM, Dicenta F, Materazzi A, Chastelliere MG.** 1995a. Preliminary studies on the mechanisms involved in *Plum pox virus* apricot resistance. *Acta Horticulturae* **384**. 553-557.
- Audergon JM, García JE, Karayiannis I, Monastra F, Jorge, O.** 1995b. Amélioration varietale qualitative et sanitaire de l'abricotier espece fruitière non excedentaire pour la diversification cultural des zones mediterraneéennes en cultures seches et irriguées. *Rapport Final del Proyecto Europeo CT 90 0016*.
- Audergon JM, Morvan G, Dicenta F, Chastelliere MG, Karayiannis I.**1995c. A method to determine the susceptibility of apricot cultivars to *Plum pox virus*. *Acta Horticulturae* **384**. 575-579.
- Avinent L, Hermoso de Mendoza A, Llácer G, García S.** 1993. Transmisión del virus de la sharka y sensibilidad varietal en albaricoquero. *II Congreso Ibérico de Ciencias Hortícolas*. Zaragoza, Abril 1993. 200-206.
- Avinent L, Hermoso de Mendoza A, Llácer G.** 1994. Transmission of *Plum pox potyvirus* in Spain. *Bulletin EPPO* **24**:3. 669-675.
- Badenes ML, Asíns MJ, Carbonell EA, Llácer G.** 1996. Genetic diversity in Apricot (*Prunus armeniaca*) aimed at improving resistance to *Plum pox virus*. *Plant Breeding* **115**:2. 133-139.
- Badenes ML, Martínez-Calvo J, García Carbonell S, Villarrubia D, Llácer G.** 1997. Descripción de variedades autóctonas valencianas de albaricquero. Generalitat Valenciana. Valencia.
- Badenes, M. L., Moustafa, T. A., and Llácer, G.** 2001. Resistance to sharka trait in a family from self-pollination of 'Lito' cultivar. - Abstracts XII International Symposium on Apricot Culture and Decline. Avignon (France) 10-14 September 2001.
- Badenes ML, Martínez-Calvo J, LLácer G.** 2003. SEOPA-1 and GOLGI-2 Apricot seedlings are resistant to *Plum pox virus*. *Hortscience* **38**:1. 135-137.
- Bailey CH, Hough LF.** 1975. Apricots. En "*Avances in Fruit Breeding*". Ed. J Janick y JN Moore. Purdue University Press. Indiana. 367-386.
- Balan V, Stoian E.** 1995. Susceptibility of certain apricot-tree to the *Plum pox virus* pathogenic action. *Acta Horticulturae* **384**. 565-569.
- Barnett OW.** 1990. A summary of potyvirus taxonomy and definitions. En "*Potyvirus Taxonomy*". Ed. Barnett OW. Springer-Verlag. Nueva York. 435-445.
- Blazek J, Paprstein F, Karesova R.** 2003. Spread of *Plum pox virus* in new plum orchards of the Czech Republic and resistant cultivars to the disease. *Acta Horticulturae*. **622**. 359-364.
- 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.
- Bianco PA, Aliverti I, Casati P, Belli B, Comes S, Fanigliulo A, Crescenzi A.** 2004. Detection and characterisation of *Plum pox virus* isolates in Lombardia and Veneto regions (Italy). *Acta horticulturae* **657**. 165-169.

- Bivol TF, Ignat F, Kukurusak EA, Kegler H.** 1987. Experiments on resistance of plum varieties and hybrids to plum pox virus in Moldavia. *Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz* **23**:6. 443-449.
- Bivol TF, Meyer V, Verderevskaja TD, Kegler H.** 1988. Progeny testing of plum hybrids for resistance to Plum pox virus. *Arch. Züchtungsforesh* **6**. 385-392.
- Bode L, Beutin L, Köhler H.** 1984. Nitrocellulose-Enzyme-Linked Immunosorbent assay NC-ELISA . A sensitive technique for the rapid visual detection of both viral antigens and antibodies. *Journal of Virological Methods* **8**. 111-121.
- Bodin M, Glasa M, Verger D, Costes E, Dosba F.** 2003. Distribution of the sour cherry isolate of *Plum pox virus* in infected *Prunus* rootstocks. *Journal of Phytopathology* **151**. 625-630.
- Boulila M, Ravelonandro.** 2004. Occurrence of *Plum pox potyvirus* in Tunisia: virus strain D identification and control measures. *Advances in Horticultural Sciences* **18**. 200-206.
- Bousalem M, Candresse TH, Quiot-Douine L, Quiot JB.** 1994. Comparison of Assessing *Plum pox virus* Variability. Further Evidence for the Existence of Two Major Groups of Isolates. *Journal of Phytopatology* **142**. 163-172.
- Breniaux D, Micoud A, Ollier M.** 1990. Etude de l'exteriorisation du virus de la sharka sur pêcher. Ministère de l'Agriculture et de la Forêt. SRPV Rhône-Alpes. Lyon.
- Burgos L, Egea J, Guerriero R, Viti R, Monteleone P, Audergon JM.** 1997. The self-compatibility trait of the main apricot cultivars and new selections from breeding programmes. *Journal of Horticultural Science* **72**:1. 147-154.
- Caglayan K, Sertkaya G, Ulubas C, Kölber M, Krizbai L.** 2004. Characterization of *Plum pox potyvirus* (PPV) By DAS-ELISA and RT-PCR/RFLP analysis in Turkey. *Acta horticulturae* **657**. 183-188.
- Câmara ML, Câmara A, Mattanovich D, Regner F, Steikellher H, Weiss H, Knapp E, Katna H.** 1992. Transformation and regeneration of plants of *Prunus armeniaca* with the coat protein gene of *Plum pox virus*. *Acta Horticulturae* **309**. 183-189.
- Câmara A, Katinger H, Laimer M.** 1994. Coat protein-mediated protection against *Plum pox virus* in herbaceous model plants and transformation of apricot and plum. *Euphytica* **77**. 129-134.
- Câmara A, Knapp E, Pühringer H, Seifert G, Hanzer H, Weiss H, Wang Q, Katinger H, Laimer M.** 1995. Gene transfer methods for the pathogen-mediated resistance breeding in fruit trees. *Acta Horticulturae* **392**. 193-202.
- Cambra R.** 1979. Selección de variedades españolas de melocotonero de carne amarilla. *ITEA* **10**. 18-20.
- Cambra M, Llácer G, Gella R.** 1981. Prospección de la sharka en España mediante la técnica inmuno-enzimática ELISA. *Anales INIA Serie Agricultura* **16**. 161-173.

- Cambra M, Gorris MT, Vela C, Camarasa E, Sanz A, García JA, Aramburu J, Llácer G, Cortés E, Miquet JG.** 1988. Problèmes de la détection de la Sharka sur abricotier. Amélioration de la sensibilité du diagnostic utilisant des anticorpes monoclonaux spécifiques. En "*Agriculture. L'abricotier*". Ed. JM Audergon. INRA Monfavet. 49-51.
- Cambra M, Asensio M, Gorris MT, Camarasa E, Garcia JA, García JA, Moya JJ, López-Abella D, Vela C, Sanz A.** 1994. Detection of *Plum pox potyvirus* using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins. *Bulletin EPPO* **24**:3. 569-578.
- Cambra MA, Crespo J, Gorris MT, Olmos A, Martínez MC, Capote N, Cambra M.** 2004a. Detection and eradication of *Plum pox virus* Type M in Aragón (Spain). *Acta Horticulturae* **657**. 231-235.
- Cambra M, Gorris MT, Capote N, Asensio M, Martínez MC, Bertolini E, Hermoso de Mendoza A, Mataix E, López A.** 2004b. Epidemiology of *Plum pox virus* in Japanese plums in Spain. *Acta Horticulturae* **657**. 195-200.
- Candresse T.** 1994. Méthods moléculaires de detection et differenciation de souches du virus de la sharka. *X Colloque sur les recherches fruitières*. Angers, Marzo de 1994. 77-84.
- Candresse T, Dosba F, Quiot JB, Dunez J.** 1993. La sharka. Le point sur les recherches. *L'Arboriculture Fruitière* **406**. 30-35.
- Candresse T, MacQuaire G, Lanneau M, Bousalem M, Wetzel T, Quiot-Douine L, Quiot JB, Dunez J.** 1994. Detection of *Plum pox potyvirus* and analysis of its molecular variability using immunocapture-PCR. *Bulletin EPPO* **24**:3. 585-595.
- Candresse T, Cambra M, Dallot S, Lanneau M, Asensio M, Gorris MT, Revers F, MacQuaire G, Olmos A, Boscia D, Quiot JB, Dunez J.** 1998. Comparison of monoclonal antibodies and polymerase chain reaction assays for the typing of isolates belonging to the D and M serotypes of *Plum pox potyvirus*. *Phytopathology* **88**. 198-204.
- Christof A.** 1938. Virus diseases of genus *Prunus* in Bulgaria. *Phytopathology Z.* **11**. 360-422.
- Clark MF, Adams AN.** 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* **34**. 51-57.
- Corvo LM, Sousa M, Nolasco G.** 1995. Detection of *Plum pox virus* using a simplified chain reaction procedure. *Acta Horticulturae* **386**. 383-390.
- Crescenzi A, Nuzzaci M, Piazzola P.** 1994. Sensitivity of the detection of *Plum pox potyvirus* by molecular assays. *Bulletin EPPO* **24**:3. 579-584.
- Crescenzi A, d'Aquino L, Comes S, Nuzzaci M, Piazzola P.** 1997. Characterization of sweet cherry isolate of *Plum pox potyvirus*. *Plant Disease* **81**. 711-714.

- Crociani A, Garaffoni M, Missere D, Pirazzini P.** 1995. Albicocco schede varietali. Ed ERSO. Firenze.
- Crosslin JM, Hammond, RW, Hammerschlag FA.** 1992. Detection of Prunus Necrotic Ringspot Virus Serotypes in Herbaceous and *Prunus* Hosts with a Complementary RNA Probe. *Plant Disease* **76**:11. 1132-1136.
- Dalot S, Bousalem M, Boeglin M, Renaud LY, Quiot JB.** 1996. Almond trees and sharka: Assessment under controlled conditions of the susceptibility of almond to the main types of *Plum pox potyvirus* and survey for natural infections in France. *Joint EPPO/MPU Conference on Almond Protection*. Valencia, Noviembre de 1996. 33.
- Dalot S, Bousalem M, Boeglin M, Renaud LY, Quiot JB.** 1997. Potential role of almond in sharka epidemics: susceptibility under controlled conditions to the main types of *Plum pox potyvirus* and survey for natural infections in France. *EPPO Bull* **27**. 539-546.
- Damsteegt VD, Waterworth HE, Mink GI, Howell WE, Levy L.** 1997. *Prunus tomentosa* as a diagnostic host for detecting of *Plum pox virus* and other *Prunus* viruses. *Plant Disease* **81**. 329-332.
- Damsteegt VD, Stone AL, Scheneider WL, Luster DG, Gildow FE.** 2004. Potential *Prunus* host range of PPV-PENN isolates by aphid transmission. *Acta Horticulturae* **657**. 201-205.
- Decroocq V, Foulongne M, Lambert P, Le Gall O, Mantin C, Pascal T, Shurdi-Levraud V, Kervella J.** 2005. Analogues of virus resistance genes map to QTLs for resistance to sharka disease in *Prunus davidiana*. *Molecular Genetics and Genomics*. **272**. 680-689.
- Della Strada G, Pennone F, Fideghelli C, Monastra F, Cobianchi D.** 1989. Monografia di cultivar di Albicocco. Ed Ministero dell'Agricoltura. Roma.
- Desvignes JC.** 1976. The virus diseases detected in greenhouse and in field by the peach seedling GF305 indicator. *Acta Horticulturae* **67**. 47-48.
- Desvignes JC.** 1988. Localisation du *Plum pox virus* dans jeunes semis de pêcher en serre. En "*Agriculture. L'abricotier*". Ed. JM. Audergon. INRA Monfavet. 47-48.
- Desvignes JC, Bois P.** 1995. La prospection précoce pour maîtriser la sharka souche M sur pêcher. *Phytoma* **476**. 39-41.
- Díaz-Pendon JA, Truninger V, Nieto C, García-Mas J, Bendahmane A, Aranda MA.** 2004. Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. *Molecular Plant Pathology*. **5**. 223-233.
- Dicenta F, Audergon JM.** 1995a. Localization of *Plum pox virus* in tissues of susceptible and resistant apricot cultivars. *Phytopathologia Mediterranea* **34**. 83-87.
- Dicenta F, Audergon JM.** 1995b. Localization of *Plum pox virus* in apricot stem and petiole tissues by tissue printing into nitrocelulose membrane. *Annals of Applied Biology* **126**. 105-110.

- Dicenta F, Audergon JM.** 1998. Inheritance of resistance to *Plum pox potyvirus* (PPV) in "Stella" apricot seedlings. *Plant Breeding* **117**. 579-581.
- Dicenta F, Audergon JM, Dufour O.** 1995. Localization of sharka virus in apricot tissue by tissue printing on nitrocelulose paper. *Acta Horticulturae* **384**. 559-563.
- Dicenta F, García JE, Gella R, Martínez-Gómez P.** 1996. Resistencia al virus de la sharka. Un carácter a mejorar en los albaricoqueros españoles. *ITEA* **92**:2. 131-143.
- Dicenta F, Martínez-Gómez P, Abad E, García-Vidal S, Llácer G.** 1998. Estado actual de la sharka (*Plum pox potyvirus*) en España. *IX Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Salamanca, Octubre de 1998. 245.
- Dicenta F, Pérez-Campoy PJ, Martínez-Gómez P, García-Brunton J, Abad E.** 1999a. *Plum pox virus* situation in Murcia (Spain). *Acta Horticulturae* **488**:2. 769-774.
- Dicenta F, Pérez-Campoy PJ, Martínez-Gómez P, García-Brunton J, Botella MA.** 1999b. Natural spread of sharka disease in fruit tree orchards in Murcia (Spain). *Acta Horticulturae* **488**:2. 775-778.
- Dicenta F, Martínez-Gómez P, Burgos L, Egea J.** 2000. Inheritance of resistance to *Plum pox potyvirus* (PPV) in apricot, *Prunus armeniaca*. *Plant Breeding* **119**. 161-164.
- Dicenta F, Martínez-Gómez P, Rubio M, Audergon, JM.** 2003. Localisation and movement of *Plum pox virus* in apricot stem tissues. *Annals of Applied Biology* **142**. 99-105.
- Dondini L, Costa F, Tataranni G, Tartarini S, Sansavini S.** 2004. Cloning of apricot RGAs (Resistance Gene Analogs) and development of molecular markers associated with Sharka (PPV) resistance. *Journal Horticultural Science and Biotechnology*. **79**. 729-734.
- Dosba F.** 1996. Sharka: Un programme européen de recherche. *Fruits & Legumes* **139**. 25-27.
- Dosba F, Lansac M, Pêcher G, Teyssier B, Piquemal JP, Michel M.** 1986. *Plum pox virus* detection by ELISA technique in peach and apricot infected trees at different growing stages. *Acta Horticulturae* **193**. 187-191.
- Dosba F, Maison P, Lasac M, Massonié G.** 1987. Experimental transmission of *Plum pox virus* (PPV) to *Prunus mahaleb* and *Prunus aviun*. *Journal of Phytopathology* **120**. 199-204.
- Dosba F, Lasac M, Desvignes JC.** 1988a. *Plum pox virus* PPV . Virus de la variole du prunier. *Phytoma* **395**. 31-32.
- Dosba F, Maison P, Lasac M, Audergon JM, Massonié G.** 1988b. Recherche de geniteurs de résistance a la sharka (PPV) chez l'abricotier. En "*Agriculture. L'abricotier*". Ed. JM Audergon. INRA Monfavet. 69-72.
- Dosba F, Lasac M, Maison P, Massonie G, Audergon JM.** 1988c. Tolerance to Plum Pox Virus in apricot. *Acta Horticulturae* **235**. 275-281.

- Dosba F, Lasac M, Maison P, Massonie G, Audergon JM.** 1989. Tolerance to *Plum pox virus* in apricot. *Acta Horticulturae* **235**. 275-281.
- Dosba F, Denise F, Maison P, Massonie G, Audergon JM.** 1991. *Plum pox virus* resistance of apricot. *Acta Horticulturae* **293**. 569-579.
- Dosba F, Orliac S, Dutranoy F, Maison P, Massonie G, Audergon JM.** 1992. Evaluation of resistance to *Plum pox virus* in apricot trees. *Acta Horticulturae* **309**. 211-219.
- Dosba F, Lansac M, Eyquard JP.** 1994a. Résistance des *Prunus* a la sharka. *Bulletin EPPO* 24:3. 691-696.
- Dosba F, Lasac M, Eyquard JP, Bonnet A, Salesses G.** 1994b. Behaviour towards PPV of *Prunus* interspecific hybrids and plums varieties. *Acta Horticulturae* **359**. 136-144.
- Dostalek J.** 1977. Sources for the breeding of frost resistant apricots. *Genetika Slechteni* **13**:2. 143-150.
- Dragoiski K, Dinkoya H, Miney I.** 2002. Rate of PPV infection of some plum cultivars depending on rootstock and management systems. *Acta Horticulturae*. **577**. 263-267.
- Dunez J.** 1988. Plum pox disease of stone fruits in Egypt. Report of a mission to Egypt. TCP/EGY/6756.
- Dunez J.** 1997. Plum pox disease: Can biotechnologies contribute to control a major disease of stone fruit?. *XVII International Symposium on virus and virus-like disease of temperate fruit crops*. Junio de 1997, Bethesda, Estados Unidos. 25-26.
- Durán S.** 1993. Melocotoneros nectarinas y pavías. Portainjertos y variedades. Editorial Fundación La Caixa. Barcelona. 151.
- Egea J.** 1998. El albaricoquero en España: Panorámica varietal. *Fruticultura Profesional* **96**. 49-55.
- Egea L, Berenguer T, Egea J, García JE.** 1988a. La población de melocotoneros de carne dura de Murcia. Ed. Consejo superior de investigaciones científicas. Murcia. 49 pp.
- Egea L, García JE, Egea J, Berenguer T.** 1988b. Origen situación y características de las variedades de albaricoquero en Murcia. *Anales de Edafología y Agrobiología* **47**:5-6. 999-1011.
- Egea J, García JE, Berenguer T.** 1994. Variedades de albaricoquero. *Horto Fruticultura Junio/94*. 56-62.
- Egea J, Burgos L, Martínez-Gómez P, Dicenta F.** 1999. Apricot breeding for sharka resistance at the CEBAS-CSIC, Murcia (Spain). *Acta Horticulturae* **488**. 153-157.
- Egea J, Dicenta F, Burgos L.** 2004a. 'Rojo Pasión' apricot. *Hortscience* **39**. 1490-1491.

- Egea J, Martínez-Gómez P, Dicenta F, Burgos L.** 2004b. 'Selene' apricot. *Hortscience* **39**. 1492-1493.
- Egea J, Ruiz D, Dicenta F, Burgos L.** 2005a. 'Murciana' apricot. *Hortscience* **40**. 254-255.
- Egea J, Ruiz D, Burgos L.** 2005b. 'Dorada' apricot. *Hortscience* **40**. 1919-1920.
- Errea P, Felipe A.** 1998. Situación actual de los patrones de albaricoquero. *Fruticultura Profesional* **96**. 12-18.
- Escalettes V, Dahuron F, Ravelonandro M, Dosba F.** 1994. Utilisation de la transgénesis pour l'obtention de pruniers et d'abricotiers exprimant le gène de la protéine capsida du *Plum pox potyvirus*. *Bulletin EPPO* **24**:3. 705-712.
- Escalettes V, Dosba F, Lansac M, Eyquard JP, Monet R.** 1998. Genetic resistance to PPV in peaches. *Acta Horticulturae* **465**. 689-697.
- Escudero V, Rodriguez J.** 1990. Situación actual del cultivo del albaricoquero. *Fruticultura Profesional* **30**. 43-50.
- Eynard A, Roggero P, Lenzi R, Conti M, Milne RB.** 1991. Test for pollen and seed transmission of *Plum pox virus* (Sharka) in apricot cultivars. *Advances in Horticultural Science* **5**:3. 104-106.
- Fanigliulo A, Comes S, Crescenzi A.** 2004. Evaluation of cherry cultivars for their response to infection by *Plum pox virus* Sweet Cherry strain. *Acta Horticulturae*. **657**. 309-316
- FAO.** 2005. Los datos de Faostat 2005. <http://faostat.fao.org>
- Felipe AJ.** 1989. Patrones para frutales de pepita y hueso. Ediciones Técnicas Europeas. Barcelona. 295-320.
- Ferri MB, Costes E, Quiot JB, Dosba F.** 2002. Systemic spread of *Plum pox virus* (PPV) in Mariana plum GF8-1 in relation to shoot growth. *Plant Pathology* **51**. 142-148.
- Festic H.** 1978. Investigations of new sharka virus hosts. *Acta Horticulturae* **74**. 233-237.
- Fraser RS.** 1990. The genetics of resistance to plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* **28**. 179-200.
- Fuchs E, Grüntzig M, Kegler H, Krczal G, Avenarius U.** 1995. A greenhouse test for characterizing PPV-strains. *Acta Horticulturae* **386**. 376-377.
- Fuchs E, Grüntzig M, Kegler H.** 1998. Investigation on the *Plum pox virus* resistance in different apricot genotypes. *Acta Virologica* **42**. 222-224.
- Fuchs E, Grüntzig M, Ernst I, Kegler H.** 2001. Comparison of apricot genotypes with different resistance level to *Plum pox virus* (PPV). *Acta Horticulturae* **550**. 103-106.
- Gabova R.** 1994. Evaluation of peach and nectarine cultivars in Bulgaria for their resistance to *Plum pox potyvirus*. *Bulletin EPPO* **24**:3. 755-760.

- Gao ZH, Johansen E, Evers S, Thomas CL, Ellis THN, Maule AJ.** 2004. The potyvirus recessive resistance gene, *sbm1*, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking. *Plant Journal* **40**. 376-385.
- García JA, Riechman JL, Laín S, Martín MT, Guo H, Simon L, Fernández A, Dominguez E, Cervera MT.** 1994. Molecular characterization of *Plum pox potyvirus*. *Bulletin EPPO* **24**:3. 443-554.
- Giunchedi L.** 1986. Piante ospiti e sintomatologia della vaiolatura delle drupacee. *Informatore Fitopatologico* **7-8**. 11-18.
- Gilbertson RL, Lucas WJ.** 1996. How do viruses traffic on the "vascular highway"? *Trends in Plant Science* **1**:8. 260-267.
- Gildow FE, Damsteegt VD, Stone AL, Schneider WL, Luster DG, Levy L.** 2004. Transmission of three north American isolates of *Plum pox virus*. Identificación of aphid vectors and specie-specific transmission from infected stone fruits. *Acta Horticulturae*. **657**. 207-211.
- Goffreda JC, Voordeckers A, Butenis-Vorsa L, Cowgill WP, Maletta MH, Frecon JL.** 1995. "NJA54" Apricot. *HortScience* **30**:2. 385-386.
- Gorris MT, Cambra M, Cambra MA, Martínez MC.** 2003. El virus de la sharka tipo Marcus (PPV-M). *Agrícola Vergel* Mayo-2003. 302-308.
- Gottwald TR, Avinent L, Llácer G, Hermoso de Mendoza A, Cambra M.** 1995. Analysis of Spatial Spread of Sharka (*Plum pox virus*) in Apricot and Peach Orchards in Eastern Spain. *Plant Disease* **79**:3. 266-278.
- Gradziel TM.** 2003. Almond species as source of new genes for peach improvement. *Acta Horticulturae* **592**. 81-88.
- Gradziel TM, Martínez-Gómez P, Dicenta F, Kester DE.** 2001. The utilization of related almond species for almond variety improvement. *Journal American Pomological Society* **55**. 100-109.
- Guiellet-Bellanger I, Audergon JM.** 2001. Inheritance of the Stark Early Orange apricot cultivar resistance to *Plum pox virus*. *Acta Horticulturae*. **550**. 111-115.
- Hadidi A, Levy L, Podleckis EV.** 1995. Polymerase Chain Reaction in Plant Pathology. En "*Molecular Methods in Plant Pathology*". Ed. R. P. Singh y U. S. Singh. CRC Lewis Publishers, Boca Raton. 167-187.
- Hamdorf G.** 1982. The detection of *Plum pox virus* by indicator plants and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Acta Horticulturae* **130**. 151-159.
- Hamdorf G.** 1987. The susceptibility of some plum cultivars to *Plum pox virus*. *Acta Horticulturae* **193**. 223-228.
- Hartmann W.** 1997. Hypersensibility for breeding sharka resistant plum hybrids. *XVII International Symposium on virus and virus-like disease of temperate fruit crops*. Junio de 1997, Bethesda, Estados Unidos. 33.
- Hartmann W, Petruschke M.** 2000. Sharka resistant plums and prunes by utilization of hypersensitivity. *Acta Horticulturae* **538**. 391-395.



- Henson JM, French R.** 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology* **32**. 81-109.
- Herranz MC, Sanchez-Navarro JA, Aparicio F, Pallas V.** 2005. Simultaneous detection of six stone fruit viruses by non-isotopic molecular hybridization using a unique riboprobe or 'polyprobe'. *Journal of Virological Methods* **124**:1-2. 49-55.
- Hesse CD.** 1975. Peachs. *Advances in fruit breeding*. Ed. J. Janick y J.N. Moore. Purdue University. Indiana: 285-300.
- Himmler G, Laimer M, Steinkelcher H, Mattanovich M, Griessler B, Katinger G.** 1987. The production of monoclonal antibodies againsts the *Plum pox virus* for the diagnosis of the sharka-disease with stone-fruit. *Mitt. Klostemeuburg* **37**. 251.
- Hough LF, Bailey CH, Ball CO.** 1962. Five new canning clingstone peach. *Fruit varieties and Horticultural Digest* **16**. 43-45.
- Hubert I, Parqueteau B, Pecheur G.** 1988. La lutte contre la sharka en France. L'action du service de la protection des vegetaux. *Bulletin Technique d'Information*. 465-480.
- Hull R.** 1989. The movement of viruses in plants. *Annual Review of Phytopathology* **27**:2. 213-240.
- Hull R, Al-Hakim A.** 1988. Nucleic acid hybridization in plant virus diagnosis and characterization. *Trends in Biotechnology* **6**. 213-218.
- Hurtado MA, Romero C, Vilanova S, Abbott AG, Liácer G, Badenes ML.** 2002. Genetic linkage maps of two apricot cultivars (*Prunus armeniaca* L.), and mapping of PPV (sharka) resistance. *Theoretical Applied Genetics* **105**. 182-191.
- James D, Varga A.** 2004. Preliminary molecular characterization of *Plum pox potyvirus* isolate W3174: Evidence of a new strain. *Acta Horticulturae* **657**. 177-182.
- Jarausch W, Babler A, Molla N, Krczal G.** 2004. First detection and molecular characterisation of PPV-M strains in plum orchards in South-Western Germany. *Acta Horticulturae* **657**. 159-164.
- Josifovic M.** 1937. Mosaic of plum. *Archiv Ministerstva Poljoprivredna* **4**:7. 131-143.
- Kalashyan A, Bilkey ND, Verderevs TD, Rubina EU.** 1994. *Plum pox virus* on sour cherry in Moldavia. *Bulletin EPPO* **24**:3. 645-649.
- Kamenova I.** 1990. Finding *Nicotiana benthamiana* as an indicator species for the *Plum pox virus* in our country Bulgaria . *Plant Science* **27**. 37-41.
- Karayiannis I.** 1989. Susceptibility of apricots cultivars to *Plum pox virus* in Greece. *Acta Horticulturae* **235**. 271-274.
- Karayiannis I.** 1995. Reaction of apricot cultivars to *Plum pox virus* infection. *Acta Horticulturae* **384**. 571-574.

- Karayiannis I, Mainou A.** 1994. Resistance to *Plum pox virus* in apricots. *Bulletin EPPO* **24**: 3. 761-766.
- Karayiannis I, Tsaftaris A.** 1999. Apricot breeding in Greece for fruit quality and resistance to *Plum pox virus* disease. *Acta Horticulturae* **488**. 111-117.
- Karayiannis I, Di Terlizzi B, Audergon JM.** 1999. Susceptibility of apricot cvs. to *Plum pox virus* disease. *Acta Horticulturae* **488**. 753-759.
- Keck M, Stöger A, Russ K.** 1992. Investigations on the spread of sharka in view of a systematic virus control. *Acta Horticulturae* **309**. 135-137.
- Kegler H, Schade C.** 1971. *Plum pox virus*. *C.M.I./A.A.B. Descriptor of Plant Viruses*.
- Kegler H, Grüntzig M.** 1988. Response of K4 plum hybrid to fruit virus infection. *Arch. Gartenbau* **36**:7. 399-406.
- Kegler H, Spaar D.** 1993. Types of and genes for resistance to plant pathogenic viruses. *Ach. Phytopath. Pflanz.* **28**. 95-107.
- Kegler H, Fuchs E, Grüntzig M, Verderevskaja TD.** 1986. Different types of resistance to plum pox in plums. *Acta Horticulturae* **193**. 201-203.
- Kegler H, Kleinhempel H, Meyer U, Berka K, Grüntzig M.** 1989. Measurement of the characteristics of the quantitative resistance in plum to *Plum pox virus* and evidence for their interrelations. *Journal of Phytopathology* **125**. 25-32.
- Kegler H, Grüntzig M, Fuchs E.** 1994. A glasshouse test detecting resistance of plum genotypes to *Plum pox virus*. *Acta Horticulturae* **359**. 152-158.
- Kegler H, Fuchs E, Grüntzig M, Krczal G, Wegener B.** 1996. Susceptibility of genotypes of the genus *Prunus* to *Plum pox virus*. *Plant Disease Protection*. **103**. 255-261.
- Kegler H, Fuchs E, Grüntzig M, Schwarz S.** 1998. Some results of 50 years of research on the resistance to *Plum pox virus*. *Acta virologica* **42**. 200-215.
- Kegler H, Schwarz S, Fuchs E, Grüntzig M.** 2000. Screening of plum, peach and apricot cultivars for resistance to *Plum pox potyvirus*. *Acta Horticulturae* **538**. 397-405.
- Kerlan C, Dunez J.** 1979. Différenciation biologique et sérologique de souches du virus de la Sharka. *Annales de Phytopathologie*. **11**:2. 241-250.
- Kervella J, Audergon JM, Pascal T, Ripetti V, Poessel JL, Duval H, Simard MH.** 1994. Amélioration génétique des *Prunus* pour la résistance aux parasites et ravageurs. Programmes de la Station de Recherches Fruitières Méditerranéennes. *Bulletin OILB/SROP* **18**:2. 86-89.
- Knnap E, Câmara Machado A, Pühringer H, Wang Q, Hanzer V, Weiss H, Katinger H, Laimer M.** 1995. Localization of fruit tree viruses by immunotissue printing in infected shoots of *Malus* sp. and *Prunus* sp. *Journal of Virological Methods* **55**. 157-173.
- Kölber M.** 2001. Workshop on Plum pox. Proc. 18<sup>th</sup> Int. Symposium on virus and virus-like disease of temperate fruit crops. *Acta Horticulturae* **550**. 249-255.

- Korschinec I, Himmler G, Sagl R, Steinneler H, Kating HW.** 1991. A PCR membrane spot assay for the detection of *Plum pox virus* RNA in katk of infected trees. *Journal of Virological Mmethods* **31**:2-3. 139-146.
- Krczal G, Avenarius U.** 1994. Detection and characterization of *Plum pox potyvirus* isolates from southern of Germany by polymerase chain reaction PCR. *Bulletin EPPO* **24**:3. 625-631.
- Krska B, Oukropec I, Polák J, Komínek P.** 2000. The evaluation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivars and hybrids resistant to sharka. *Acta Horticulturae* **538**. 143-146.
- Krska B, Salava J, Polák J, Komínek P.** 2002. Genetics of resistance to *Plum pox virus* in apricot. *Plant Protection Science* **38**. 180-182.
- Kunze L, Krczal H.** 1971. Transmision of sharka virus by aphids. *8 Symposium européen sur les maladies à virus des arbres fruitiers*. Burdeos, Junio de 1971. 255-262.
- Labonne G, Lauriaut F.** 1991. Evaluation du nombre de pucerons qui atterrissent sur un arbre en relation avec la dissemination du *Plum pox virus*. *Phytopathologia Mediterranea*. **30**. 167-172.
- Labonne G, Lauriot F, Yvon M, Adamolle C, Quiot JB.** 1994a. Dissémination du *Plum pox potyvirus* par les pucerons. analyse des vecteurs potentiels du virus dans un verger d'abricotiers. *Bulletin EPPO* **24**:3. 681-690.
- Labonne G, Ravelonandro M, Yvon M, Adamolle C, Quiot JB, Monsion M.** 1994b. Evaluation de la résistance d'une lignée transformée de *Nicotiana benthamiana* à l'inoculation et à l'acquisition du *Plum pox potyvirus* par puceron. *Bulletin EPPO* **24**:3. 731-740.
- Laimer M, Câmara A, Hanzer V, Weiss H, Regner F, Steinkellner H, Mattanovich D, Plail R, Knapp E, Kalthoff B, Katinger H.** 1992. Regeneration of transgenic plants of *Prunus armeniaca* containing the coat protein gene of *Plum pox virus*. *Plant Cell Reports* **11**. 25-29.
- Lain S, Riechman JL, García JA.** 1989. The complete nucleotide sequence of *Plum pox potyvirus*. *Virus Research* **13**. 157-172.
- Lansac M, Bernhard R, Massonie G, Maison P, Kerlan C, Dunez J, Morvan G.** 1982. La sharka: connaissances actuelles. 3 Journ.Franc.Etud.Info.ACTA.Paris, Octobre 1979. 452-468.
- Lahmatova IT, Verderesvskaia TD, Juravel AM, Zemtchik EZ.** 1998. Inheritance of *Plum pox virus* resistance in plums hybrids. *Acta Horticulturae* **472**. 441-445.
- Layne REC, Gadsby MF.** 1995. Determination of cold hardiness and estimation of potential breeding value of apricot germplasm. *Fruit Varieties Journal* **49**. 242-248.
- Lee S, Wen J.** 2001. A phylogenetic analysis of *Prunus* and the Amygdaloideae (Rosaceae) using ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany* **88**:1. 150-160.

- Levy L, Hadidi A.** 1994. A simple and rapid method for processing tissue infected with *Plum pox potyvirus* for use with specific 3' non-coding region RT-PCR assays. *Bulletin EPPO* **24**:3. 595-604.
- Levy L, Damsteegt VS, Welliver R.** 2000. First report of *Plum pox virus* (sharka disease) in *Prunus persica* in the United States. *Plant Disease* **84**. 202.
- Lichou J, Audubert A.** 1992. L'abricotier. Ed. Ctifl.
- Lichou J.** 1998. Apricot les variétés, mode d'emploi. Ed. Ctifl. 163-182.
- Llácer G.** 1989. La Sharka. Ficha fitosanitaria. *Fruticultura Profesional* **24**. 23-24.
- Llácer G.** 1995a. Virus, viroids and mycoplasmas disease of apricots. *Acta Horticulturae* **384**. 511-520.
- Llácer G.** 1995b. Programa de lucha contra la sharka en la Comunidad Valenciana. *El agricultor cualificado* **2**. 51-56.
- Llácer G.** 1994. Sharka en frutales. Actualización. *VII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Sitges, Octubre de 1994. 21.
- Llácer G, Cambra M, Laviña A.** 1985. Detección y primeros estudios del virus de la sharka en España. *Anales INIA Serie Agricultura* **28**:3. 157-166.
- Lommel SA, McCain AH, Morris TJ.** 1982. Evaluation of Indirect-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. *Phytopatology* **72**:8. 1018-1022.
- López-Moya JJ, Canto T, López-Abella D, Díaz-Ruiz JR.** 1994a. Differentiation of Mediterranean *Plum pox virus* isolates by coat protein analysis. *Plant Pathology* **43**. 164-171.
- López-Moya JJ, Sanz A, Cambra M, Gorris MT, Anaya C, Miguet JG, Cortés E, López-Abella.** 1994b. Production and characterization of monoclonal antibodies to *Plum pox virus* and their use in differentiation of Mediterranean isolates. *Archives of Virology* **135**. 293-304.
- Mainou A, Syrgiannidis G.** 1992. Evaluation of peach and nectarine varieties according to resistance to sharka (plum pox) virus RNA. *Acta Horticulturae* **309**. 221-227.
- Maison P, Massonie G.** 1982. Premières observations sur la spécificité de la résistance du pêcher a la transmission aphidienne du virus de la sharka. *Agronomie* **2**:7. 681-683.
- Maiss E, Timpe U, Briske A, Jelkmann W, Casper R, Himmler G, Mattanovich D, Katinger HW. D.** 1989. The complete nucleotide sequence of *Plum pox virus* RNA. *Journal General Virology* **70**. 513-524.
- Malinowski T, Zawadzka B.** 1992. The suitability of modified ELISA for detection of *Plum pox virus*. *Acta Horticulturae* **309**. 157-161.
- MAPA.** 2003. Base de datos. Anuario estadística agroalimentaria 2003. [http://www.mapya.es/es/estadistica/pags/anuario/Anu\\_03/indice.asp](http://www.mapya.es/es/estadistica/pags/anuario/Anu_03/indice.asp)

- Marenaud C.** 1979. Caracterisation d'ecotypes du virus de la sharka par analyse du comportement de la lignée GF-305 de *Prunus persica*. *Acad. Agric. France*. 110-115.
- Marenaud C, Yürektürk M.** 1974. Problemes posés par la detection du virus de la sharka. *Pomologie Française* **16**. 207-214.
- Marenaud C, Lansac M, Maison P.** 1975. Essais préliminaires de caractérisation "d'écotypes" de Sharka. *Acad. Agric. France* **61**. 1108-1119.
- Martínez-Gómez P.** 1998. Principios y perspectivas de la mejora genética del albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.). *Fruticultura Profesional* **96**. 40-48.
- Martínez-Gómez P, Dicenta F.** 1999. Evaluation of resistance to sharka in the breeding apricot program in CEBAS-CSIC in Murcia. *Acta Horticulturae*. **488**. 731-737.
- Martínez-Gómez, P, Dicenta F.** 2000. Evaluation of resistance of apricot cultivars to a Spanish isolate of *Plum pox potyvirus* (PPV). *Plant Breeding* **119**. 179-181.
- Martínez-Gómez P, Dicenta F.** 2001. Distribution of coat protein and nucleic acid of *Plum pox virus* (PPV) in seedlings of peach rootstock GF305 and apricot cv. Real Fino. *Phytopathologia Mediterranea* **40**. 157-164.
- Martínez-Gómez P, Dicenta F, Audergon JM.** 2000. Behaviour of apricot cultivars in the presence of sharka (*Plum pox potyvirus*): a review. *Agronomie* **20**: 407-422.
- Martínez-Gómez P, Dicenta F, Egea J.** 2003a. Effect of a traditional control meted on the spread of sharka in an apricot orchard in Spain. *Phytopathologia Mediterranea* **42**. 161-66.
- Martínez-Gómez P, Rubio M, Dicenta F, Aparicio F, Pallás V.** 2003b: Comparative analysis of three diagnostic methods for the evaluation of *Plum pox virus* (PPV) resistance in apricot breeding programs. *Acta Horticulturae* **622**. 353-357.
- Martínez-Gómez P, Rubio M, Dicenta F, Gradziel T.** 2004. Resistance to *Plum pox virus* Dideron isolate RB3.30) in a group of California Almonds and transfer of resistance to Peach. *Journal American Society for Horticultural Science* **129**. 544-548.
- Más P, Sánchez-Navarro J, Sánchez-Pina MA, Pallás V.** 1993. Chemiluminiscent and colorigenic detection of cherry leaf roll virus with digoxigenin-labeled RNA probes. *Journal of Virological Methods* **45**. 93-102.
- Más P, Pallás V.** 1995. Non-isotopic tissue printing hybridization. A new technique to study long-distance plant virus movement. *Journal of Virological Methods* **52**. 317-326.
- Más P, Pallás V.** 1996. Long-distance movement of cherry leaf roll virus in infected tobacco plants. *Journal of General Virology* **77**. 531-540.
- Materazzi A, Audergon JM, Bruchou C, Lecoq H.** 1991. Sensibilité de sémis de pêcher GF305 a la "sharka" ou PPV. Resultats preliminaires concernant la

comparaison de deux types d'inoculation. *2<sup>o</sup> Rencontre du Group Abricotier*. Avignon, Mayo de 1991. 147-148.

- Maule AJ.** 1991. Virus movement in infected plants. *Plant Sciences* **9**:6. 457-473.
- Miller SA, Martin RR.** 1988. Molecular diagnosis of plant disease. *Annual Review of Phytopathology* **26**. 409-436.
- Minoiu N.** 1994. Recent results on resistance to *Plum pox potyvirus* in plum in Romania, and on the epidemiology of the disease. *Bulletin EPPO* **24**:3. 775-780.
- Morvan G, Chastelliere M.** 1980. An evaluation of herbaceous host of sharka *Plum pox virus*. *Acta Phytopatologica Academiae Scientiarum Hungaricae* **15**. 297-302.
- Morvan G, Audergon JM.** 1989. La Sharka une menace toujours présente. *L'Arboriculture Fruitière* **423**. 35-40.
- Moustafa TA, Badenes, Martínez-Calvo J, Llácer G.** 2001a. Studies on Plum pox (Sharka) resistance in apricot. *Acta Horticulturae* **550**. 117-120.
- Moustafa TA, Badenes ML, Martínez-Calvo J, Llácer G.** 2001b. Determination of resistance to sharka (plum pox) in apricot. *Scientia Horticulturae* **91**. 57-70.
- Navrátil M, Cikánek D, Hilbert I, Kristofová H, Karesová R.** 1992. Monoclonal antibodies against *Plum pox virus*. *Acta Horticulturae* **309**. 169-173.
- Navrátil M, Safarova D, Karesova R, Petrzik K.** 2005. First Incidence of *Plum pox virus* on Apricot Trees in China. *Plant Disease* **89**. 338.
- Nemchinov L, Hadidi A.** 1996. Characterization of the sour cherry strain of *Plum pox virus*. *Phytopathology* **86**:6. 575:580.
- Nemchinov L, Hadidi A, Maiss E, Cambra M, Candress T, Damsteegt V.** 1996. Sour Cherry Strain of *Plum pox virus* (PPV): Molecular and Serological Evidence for a New Subgroup of PPV Strains. *Molecular Plant Pathology* **86**:11. 1215-1221.
- Németh M.** 1986. Virus mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees. Martinus Nijhoff publishers. Dordrecht.
- Németh M.** 1994. History and importance of plum pox in stone-fruit production. *Bulletin EPPO* **24**:3. 525-537.
- Németh M, Kölber M.** 1982. Additional evidence on seed transmission of *Plum pox virus* in apricot peach and plum proved by ELISA. *Acta Horticulturae* **130**. 293-300.
- Nikolaeva OV.** 1995. Nucleic Acid Hybridization Methods in Diagnosis of Plant Viruses and Viroids. En "*Molecular Methods in Plant Pathology*". Ed. R. P. Singh y U. S. Singh. CRC Lewis Publishers. Boca Raton. 133-143.
- Nono-womdim R, Gebre-Selassie K, Marchoux G.** 1993. Migration des virus dans la plante. *Revue bibliographique. Agronomie* **13**. 785-813.
- Olmos A, Bertolini E, Cambra M.** 2002. Simultaneous and co-operational amplification (Co-PCR): a new concept for detection of plant viruses. *Journal Virological Methods* **106**. 51-59.

- Pallás V, Más P, Sánchez-Navarro J.** 1997. Detection of plant RNA viruses by non-isotopic dot-blot hybridization. En "*Plant Virology Protocols. From virus isolation to transgenic resistance*". De. G. Foster y S. Taylor. Human Press. Ottawa.
- Pallás V, Sánchez-Navarro JA, Mas P, Cañizares MC, Aparicio F, Marcos JF.** 1998. Molecular diagnostic techniques and their potential role in stone fruit certification schemes. *Options Méditerranéennes Serie B* **19**. 191-208.
- Papstein F, Karesová R, Navrátil M.** 1998. Results of plum pox virus transmission into germplasm of plums. *Acta Horticulturae* **478**. 279-282.
- Pascal T, Pfeiffer P, Kervella.** 2002. Preliminary observations on the resistance to sharka in peach and related species. *Acta Horticulturae* **592**. 699-704.
- Pasquini G, Barba M.** 1988. Anticorpi monoclonali. Preperazione e loro impiegin virologia vegetale. *Informatore Fitopatologico* **4**. 61-66.
- Pasquini G, Mazzei M, Barba M.** 1995a. Improvement of detection of *Plum pox virus* in stone fruits by ELISA. *Acta Horticulturae* **384**. 543-547.
- Pasquini G, Mazzei M, Pilotti M, Barba M.** 1995b. Characterization of PPV isolates using monoclonal antibodies. *Acta Horticulturae* **386**. 346-353.
- Paunovic M.** 1988. Apricot germplasm breeding selection cultivar roostock and environmental. *Acta Horticulturae* **209**. 13-28.
- Pelet F, Bovey R.** 1968. Les symptômes de la Sharka sur les pruniers, pruneautiers abricotiers et pêchers. *Agricultura Romande* **7**.80-84.
- Pérez-González S.** 1992. Associations among morphological ann phenological characters representing apricot germplasm in central México. *Journal American Society Horticultural Science* **117**:3. 486-490.
- Pérez-González S.** 1997. Breeding for powdery mildew (*Sphaerotheca pannosa*) resistance in the subtropical region Central Mexico. *Acta Horticulturae* **441**. 87-90.
- Petruschke M, Schröder M.** 1995. Resistance and fruit tolerance of prune and plum cultivars and hybrids against the sharka disease (*Plum pox virus*). *Erwerbsobstbau* **37**. 152-157.
- Pinochet J, Torrents J, Felipe A.** 1998. Portainjertos de ciruelo, cerezo y albaricoquero desde la perspectiva de la replantación y patógenos del suelo. *Fruticultura Profesional* **96**. 6-10.
- Polák J.** 1995. Reliability of detection and relative concentration of *Plum pox virus* determined by ELISA in an infected peach tree during the vegetation period. *Journal of Plant Diseases and Protection* **102**. 16-22.
- Polák J, Chod J, Oukropec I.** 1992. The production of sharka free propagating material of apricots and peaches in Czech Republic. *Acta Horticulturae* **309**. 139-143.

- Polák J, Chod J, Oukropec I, Krska B, Pívalová J, Jansta Z.** 1995a. Virological programme in breeding of apricots for resistance to *Plum pox virus* in the Czech Republic. *Acta Horticulturae* **384**. 581-584.
- Polák J, Kominek P, Jokes M, Oukropec I, Krska B.** 1995b. The evaluation of resistance of apricots to *Plum pox virus* by ELISA and ISEM. *Acta Horticulturae* **386**. 285-289.
- Polák J, Oukropec I, Kominek P, Krska B, Bittóová M.** 1997. Detection and evaluation of resistance of apricots and peaches to *Plum pox virus*. *Journal of Plant Diseases and Protection* **104**:5. 466-473.
- Polák J, Pívalová J, Dowler WM, Miller W.** 2003. Evaluation of american peach cultivars for resistance to *Plum pox virus*. *Plant Protection Science* **39**:1. 1-6.
- Pracros, P, Detienne G, Sarraquigne C, Dunez J.** 1981. Intérêts comparés de l'indexage sur semis de pêcher GF305 et du diagnostic immunoenzymatique ELISA pour la détection de virus des espèces fruitières. *Agronomie* **1**:7. 535-540.
- Pribék D, Gáborjányi R, Palkovics L.** 2001. Molecular characterization of *Plum pox virus* almond isolate. *Acta Horticulturae* **550**. 91-95.
- Provvidenti R, Hampton RO.** 1992. Sources of resistance to viruses in *Protyviridae*. *Archives of Virology Supplement S5*: 189-211.
- Quiot JB, Labonne G, Boeglin M, Adamolle C, Renaud LY, Candresse T.** 1995. Behaviour of two isolates of *Plum pox virus* inoculated on peach and apricot trees. firts results. *Acta Horticulturae* **386**. 290-294.
- Rankovic M.** 1980. Use of *Prunus tomentosa* for the detection and differentiation of sharka and other viruses of plum. *Acta Phytopathologica* **15**. 303-308.
- Rankovic M.** 1982. The degree of sensitivity of some plum cultivars and hybrids to sharka (*Plum pox*) virus disease. *Acta Horticulturae* **130**. 93-98.
- Rankovic M, Sutic D.** 1986. Resistance of some peach cultivars and variable pathogenicity of the sharka (*Plum pox*) virus. *Acta Horticulturae* **193**. 193-199.
- Rankovic M, Paunovic S.** 1988. Further studies on the resistance of plums to sharka (*Plum pox*) virus. *Acta Horticulturae* **235**. 283-289.
- Rankovic M, Dulic-Markovic I, Paunović S.** 1999. Sharka virus in apricot and its diagnosis. *Acta Horticulturae* **488**. 783-786.
- Ravelonandro M, Dunez J.** 1995. Récents progrès dans la lutte contre la sharka des arbres fruitieres à noyau. *Cahiers Agriculture* **4**. 153-161.
- Ravelonandro R, Delbos R, Varveri C, Dunez J.** 1988. Capsid protein of *Plum pox virus*. Structure and comparison with other Potyvirus. *Acta Horticulturae* **235**. 305-311.
- Ravelonandro M, Scorza R, Callahan A, Cordts J, Monsion M, Fuchs M, Delbos R, Bachelier J, Gonsalves D, Dunez J.** 1994. Production of plants of *Nicotiana benthamiana* and *Prunus domestica* transgenic for *Plum pox potyvirus*



- coat protein and demonstration of PPV resistance in transformed *N. benthamiana*. *Bulletin EPPO* **24**:3. 731-740.
- Refatti E, Osler R, Loi N, Carraro L, Benetti U, Tomasi A, Vindimian ME.** 1988. An attempt in progress to eradicate Plum Pox. *Acta Horticulturae* **235**. 291-297.
- Regner F, Câmara A, Laimer M, Steinkellner H, Mattanovich D, Weiss H, Katinger H.** 1992. Coat protein mediated resistance to *Plum pox virus* in *Nicotiana clevelandii* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell Report* **11**. 30-33.
- Reid PD, Pont-Lezica RF, Campillo E, Taylor R.** 1992. Tissue printing: Tools for the study of anatomy, histochemistry and gene expression. Academic Press. San Diego.
- Revers F, Le Gall O, Candresse T, Maule AJ.** 1999. New advances in understanding the molecular biology of plant-potyvirus interactions. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **12**. 367-376.
- Riechman JL, Lain S, García JA.** 1992. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology* **73**. 1-16.
- Rodríguez J, Hita I.** 1995. La sharka principal problema viral de los frutales de hueso. Fundación la Caixa. Barcelona. 65-67.
- Rodríguez J, Andrés V, Gil L, Martínez J, Hita I.** 1995. Sensibilidad a Sharka en variedades de albaricoquero de Murcia. En *Frutales de Hueso*. Fundación La Caixa. Barcelona. 69-72.
- Rowhani A, Maningas MA, Lile LS, Daubert SD, Golino DA.** 1995. Development of a Detection System for Viruses of Woody Plants Based on PCR Analysis of Immobilized Virions. *Phytopathology* **85**:3. 347-352.
- Roy AS, Smith IM.** 1994. Plum pox situation in Europe. *Bulletin EPPO* **24**:3. 515-525.
- Rubio M, Martínez-Gómez P, Dicenta F.** 2003. Resistance of almond cultivars to *Plum pox virus* (sharka). *Plant Breeding* **122**. 462-464.
- Ruffel S, Dussault MH, Palloix A, Moury B, Bendahmane A, Robaglia C, Caranta C.** 2002. A natural recessive resistance gene against *Potato virus Y* in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (*eIF4E*). *Plant Journal* **32**. 1067-1075.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N.** 1985. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**. 487-491.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor. Nueva York.
- Sánchez-Navarro J, Cano E, Pallás V.** 1996. Non-radioactive molecular hybridization of carnation mottle virus in infected carnations and its comparison to serological and biological techniques. *Plant Pathology* **45**. 375-382.

- Sánchez-Navarro JA, Aparicio F, Rowhani A, Pallás V.** 1998. Comparative analysis of ELISA, nonradioactive molecular hybridization and PCR for the detection of prunus necrotic ringspot virus in herbaceous and *Prunus* hosts. *Plant Pathology* **47**. 780-786.
- Sánchez-Navarro JA, Aparicio F, Herranz MC, Minafra A, Myrta A, Pallas V.** 2005. Simultaneous detection and identification of eight stone fruit viruses by one-step RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology* **111**:1. 77-84.
- Sánchez-Vizcaíno JM, Cambra M.** 1981. Técnicas Inmunoenzimáticas en patología Animal y Vegetal. *Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias*. Madrid.
- Scorza R, Malinowski T, Minoiu N, Ravelonandro M, Cambra M.** 2004. Potential use of transgenic plums resistant to *Plum pox virus* field infection. *Acta Horticulturae* **657**. 321-324.
- Sedlakowa E, Gallo J.** 1994. Susceptibility of apricot cultivars to artificial inoculations with *Plum pox potyvirus* and use of ELISA for its evaluation. *Bulletin EPPO* **24**:3. 771-775.
- Séron K, Haenni AL.** 1996. Vascular movement of plant viruses. *Molecular Plant Microbe Interactions* **9**:6. 435-442.
- Smith IE, Candresse T, Dosba F.** 1994. La Sharka. Où en est-on en Europa et ailleurs?. *L'Arboriculture Fruitière* **471**. 29-42.
- Sutic D.** 1965. Vegetative effect of some plants on the curing of plum infected with sharka (*Plum pox virus*). *Zastita Bilja* **2**. 85-88.
- Sutic D.** 1971. Comparative studies of some sharka (*Plum pox*) virus isolates. *Annales de Phytopathologie* **2**. 185-192.
- Sutula CL, Gillet JM, Morrissey SM, Ramsdell DC.** 1986. Interpreting ELISA Data and Establishing the Positive-Negative Threshold. *Plant Disease* **70**:8. 722-726.
- Syrgiannidis G.** 1980. Selection of two apricot varieties resistant to sharka virus. *Acta Phytopathologica Scientiarum Hungaricae* **15**. 85-87.
- Syrgiannidis G, Mainou A.** 1980. Recherche sur la sensibilité de variétés de pêcher a la maladie de la sharka (*Plum Pox*). *Agricultural Research* **4**. 61-71.
- Syrgiannidis G, Mainou A.** 1986. Study of the sensitivity to sharka (*Plum Pox*) virus of 33 peach and nectarine varieties. *Acta Horticulturae* **193**. 217-222.
- Syrgiannidis G, Mainou A.** 1991. Two new apricot varieties resistant to sharka (*Plum Pox*) disease created by crossing. *Deuxièmes rencontres sur l'abricotier*. Avión, Mayo de 1991. 136.
- Syrgiannidis G, Mainou A, Karayiannis I.** 1988. Recherche pour la sélection et creation des variétés d'abricotier a la maladie du virus de la sharka. En "*Agriculture. L'abricotier*". Ed. J. M. Audergon. INRA Monfavet. 63-67.
- Tet-Fatt C, Yang-Sun C.** 1992. Detection and localization of viruses in orchids by tissue-print hybridization. *Plant Pathology* **41**. 355-361.

- Teycheney PY, Tavert G, Delbos R, Ravelonandro M, Dunez J.** 1989. The complete nucleotide sequence of *Plum pox virus* RNA (strain D). *Nucleic Acids Research* **17**. 10115-10116.
- Thakur PD, Bhardwaj SV, Garg ID, Khosla K, Sharma DR.** 1992. Detection of *Plum pox virus* in stone fruits from India. *Symposium on current Trends in Plant Disease Management*. Maharashtra. India.
- Thomidis T, Karayiannis I.** 2003. Using ELISA and PCR to test the potential for spread of *Plum pox virus* by seeds of different stone fruits cultivars. *New Zealand Journal Crop Horticultural Science* **31**. 69-72.
- Töbias I, Gyozo K, Kölber M.** 1992. Diagnosis of *Plum pox virus* by ELISA. *Acta Horticulturae* **309**. 163-169.
- Tradafirescu M, Topor E.** 1999. Investigation on the susceptibility of some apricot to Plum pox (Sharka) virus. *Acta Horticulturae* **488**: 787-791.
- Triolo E, Ginanni M, Materazzi A, Paolucin.** 1993. Further evidence of the non transmission through seed of *Plum pox virus* in apricot. *Advances in Horticultural Science* **7**:3. 109-111.
- Van Oosten HJ.** 1971. Further information about the herbaceous host range of sharka (*Plum pox*) virus. *Annales de Phytopathologie* **2**. 195-201.
- Varveri C, Bretout C, Dunez J.** 1986. Synthesis and Characterization of a DNA Complementary to *Plum pox virus* RNA to be Used as a Specific Detection Probe. *Acta Horticulturae* **193**. 173-181.
- Varveri C, Ravelonandro M, Dunez J.** 1987. Construction and Use of a Cloned cDNA Probe for Detection of *Plum pox virus* in Plants. *Phytopatology* **77**:8. 1221-1224.
- Varveri C, Candresse T, Cugusi M, Ravelonandro M, Dunez J.** 1988a. Use of a <sup>32</sup>P-Labeled Transcribed RNA Probe for Dot Hybridization Detection of *Plum pox virus*. *Phytopatology* **78**:10. 1280-1283.
- Varveri C, Candresse T, Cugusi M, Ravelonandro M, Dunez J.** 1988b. Comparison of ELISA y molecular hybridization for *Plum pox virus*. En "*Agriculture. L'abricoquier*". Ed. JM Audergon. INRA Monfavet. 53-54.
- Vilanova S, Romero C, Abbott AG, Liácer G, Badenes ML.** 2003. An apricot F2 progeny linkage map based on SSR and AFLP markers, mapping *Plum pox virus* resistance and self-incompatibility traits. *Theoretical and Applied Genetics* **107**. 239-247.
- Viršček M, Mavrič I, Urbančič-Zemljič M, Škerlavaj V.** 2004. Detection of *Plum pox potyvirus* in weeds. *Acta Horticulturae* **657**. 251-254.
- Ward CW, Shukla PD.** 1991. Taxonomy of potyvirus: Current problems and some solutions. *Intervirology* **32**. 269-296.
- Waterworth HE.** 1994. Viruses detected in stone fruit germplasm entering the United States. *HortScience* **29**:8. 917.

- 
- Watkins R.** 1976. Cherry, plum, peach, apricot and almond. *In* Evolution of crop plants. Eds. Simmonds, N.W. Longman. London. UK.
- Wetzel T, Tavert G, Teycheney PY, Ravelonandro M, Candresse T, Dunez J.** 1990. Dot hybridization detection of *Plum pox virus* using <sup>32</sup>P-labeled RNA probes representing non-structural viral protein genes. *Journal of Virological Methods* **30**. 161-172.
- Wetzel T, Candresse T, Ravelonandro M, Dunez J.** 1991a. A polymerase chain reaction assay adapted to *Plum pox potyvirus* detection. *Journal of Virological Methods* **33**. 355-365.
- Wetzel T, Candresse T, Ravelonandro M, Delbos RP, Mayzad H, Aboul-Ata AE, Dunez J.** 1991b. Nucleotide sequence of the 3'-terminal region of the RNA of the EL Amar strain of *Plum pox potyvirus*. *Journal of General Virology* **72**. 1741-1746.
- Wetzel T, Candresse T, Macquaire G, Ravelonandro M, Dunez J.** 1992a. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for *Plum pox potyvirus* detection. *Journal of Virological Methods* **39**. 27-37.
- Wetzel T, Candresse T, Macquaire G, Ravelonandro M, Delbos RP, Mayzad H, Dunez J.** 1992b. Molecular techniques for *Plum pox potyvirus* (PPV) detection and cloning of the genomic RNA from an atypical strain. PPV El Amar. *Acta Horticulturae* **309**. 175-181.
- Zar JH.** 1999. Biostatistical analysis. - Ed. Prentice Hall, New Jersey, USA. 664 pp.
- Zawadzka B, Rozpara E, Grzyb Z, Malinowski T.** 1994. Susceptibility of some North American and Yugoslav plum cultivars to *Plum pox potyvirus* in Poland. *Bulletin EPPO* **24**:3. 767-770.
- Zeven AC, De Wet J.** 1993. Dictionary of cultivated plants and their regions of diversity. *International Book Distributors*. Dehra Dun. 259 pp.



## **8. Anexos**



## 8.- ANEXOS

### ANEXO 1: Cultivo de plantas en invernadero

*Tabla de abonado*

Producto N. comercial (®)	Abono soluble <i>Soluplant 25-5-16</i>	Micronutrientes <i>Nutrishell</i>	Quelato de hierro <i>Ferrishell plus</i>
<b>Riquezas</b>	N 25% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 5% N nítrico 14,4% N amoniacal 10,6% K <sub>2</sub> O 16%	B (EDTA) 0,87% Mo (EDTA) 0,02% Cu (EDTA) 1,70% Fe (EDTA) 3,35% Zn (EDTA) 0,60%	Fe (EDDHA) 6%
<b>Frecuencia</b>	15 días	15 días	30 días
<b>Dosis</b>	0,5 g/l	0,5 g/l	0,5 g/l

*Tabla de tratamientos fitosanitarios*

Tratamiento	Acción	Materia activa	Nombre Comercial (®)	Dosis
<b>A</b>	Fungicida	Bitertanol 25% p/p	<i>Baycor</i>	1,5 g/l
	Acaricida	Azociclotim 25% p/p	<i>Peropal</i>	1 g/l
	Insecticida	Imidacloprid 20% p/v	<i>Confidor</i>	1,25 cc/l
<b>B</b>	Fungicida	TMTD 80% p/v	<i>Thiram</i>	2,5 g/l
	Acaricida	Tetradifon 6% p/v	<i>Cekudit</i>	2,5 cc/l
	Insecticida	Taufluralinato 24% p/v	<i>Klartan</i>	1,25 cc/l
<b>C</b>	Fungicida	Trifarina 1% p/v	<i>Saprol</i>	1,5 cc/l
	Acaricida	Fenbutestan 55%	<i>Partner</i>	1 cc/l
	Insecticida	Clorpirifos 18%p/v	<i>Dorsan</i>	3 cc/l



## ANEXO 2: Técnica ELISA-DASI

### Etapas del desarrollo de la técnica:

1.- Tapizado o sensibilización del inmuoadsorbente: Consiste en la adición de las inmunoglobulinas policlonales específicas para PPV, en *tampón carbonato* a pH 9,6 en una concentración de 1,42µg/ml de tampón. En cada pocillo de la placa ELISA introducimos 200µl de la disolución colocándola en un recipiente de plástico cerrado herméticamente y dejándola en incubación durante 4 horas a una temperatura de 37 °C.

2.- Lavado: Posteriormente se procede al lavado 3 veces con *solución de lavado*.

3.- Adición de la muestra: Se trituran las muestras con un *tampón de extracción* con una relación peso/volumen 1/10, empleando un homogeneizador de vástago. El extracto vegetal es depositado en los pocillos (200 µl/pocillo). Posteriormente se incuba la placa durante 16 horas a una temperatura de 4 °C.

4.- Lavado: Igual que en la etapa 2.

5.- Adición del anticuerpo monoclonal: Consiste en la adición de los anticuerpos en una proporción de 0.1µg/ml de *tampón conjugado*. En cada pocillo de la placa se depositan 200µl de la disolución dejando la misma cerrada y en incubación durante 2 horas a 37 °C.

6.- Lavado: Igual que en la etapa 2.

7.- Adición de inmunoglobulinas anti-ratón conjugadas con fosfatasa alcalina: Consiste en la adición de inmunoglobulinas conjugadas con fosfatasa alcalina (REAL-DURVIZ) en una proporción de 0,1 µg/ml de *tampón conjugado*. En cada pocillo de la placa se depositan 200 µl de la disolución dejándola en incubación durante 2 horas a una temperatura de 37 °C.

8.- Lavado: Igual que en la etapa 2.

9.- Revelado de la reacción y lectura de resultados: Para el revelado de las placas se añaden 200 µl de disolución (1 mg/ml) de sustrato de la fosfatasa alcalina (*p*-nitrofenolfosfato) en *tampón sustrato*. Posteriormente la placa se incuba a temperatura ambiente. Durante el transcurso de este tiempo se realizarán lecturas colorimétricas de densidad óptica (DO) a 405 nm periódicas a los 30, 60 y 90 minutos de la adición del sustrato.

**Equipo y material principal:**

- Juego de Micropipetas BIOHIT.
- Placas ELISA (WELLS).
- Lector ELISA Stat Fax 2.100 (AWARENESS TECHNOLOGY).
- Estufa HERAEUS.

**Reactivos y tampones utilizados:**

- Inmunoglobulinas policlonales de conejo anti-PPV (REAL-DURVIZ).
- Anticuerpos específicos de PPV: 5B-IVIA (REAL-DURVIZ).
- Inmunoglobulinas de cabra anti-ratón marcadas con fosfatasa alcalina (REAL-DURVIZ).
- Sustrato de fosfatasa alcalina P-nitrofenilfosfato (SIGMA).
- *Tampón carbonato* (pH 9,6) para 1.000 ml:
  - 1,59 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$
  - 2,93 g  $\text{NaHCO}_3$
- *Solución agua fisiológica tamponada* (AFT) (pH 7,2-7,4); para 1.000 ml:
  - 8,00 g  $\text{ClNa}$
  - 0,20 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
  - 2,17 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
  - 0,20 g  $\text{ClK}$
- *Solución de lavado*; para 1.000 ml:
  - 0,50 ml Tween 20 (SIGMA)
  - 500 ml AFT
  - 500 ml Agua destilada
- *Tampón de extracción*; para 1.000 ml:
  - 2,00 g Dietilditiocarbamato sódico (DIECA) (SIGMA).
  - 20,0 g Polivinil pirrolidona (PVP10) (SIGMA).
  - 1.000 ml AFT
- *Tampón conjugado*; para 100 ml:
  - 100 ml AFT
  - 0,50 g Albúmina de suero bovino (BSA) (BOEHRINGER & MANNHEIM)
- *Tampón Substrato* para 100 ml:
  - 97 ml Dietanolamina;
  - Diluir en 800 ml de agua destilada, ajustar pH 9,8 con HCl, ajustar a 100ml.

## **ANEXO 3: Hibridación molecular no radioactiva**

### **3.1.- Síntesis de la sonda**

#### **Etapas del desarrollo de la técnica:**

1.- Síntesis de la sonda: Añadir en un tubo Eppendorf en el siguiente orden:

2  $\mu$ l de *tampón de transcripción 10X*.

6  $\mu$ l de *DTT*.

1,5  $\mu$ l de RNasin.

3  $\mu$ l de plásmido PBscribe.

2  $\mu$ l de NTPs digoxigenados (UTP-dig) (10X).

25,5  $\mu$ l de agua tratada (DEPC).

6  $\mu$ l de RNA pol. SP6, T7 o T3.

Incubar 1 hora a 37 °C.

Añadir 1  $\mu$ l de *DNaseI*/  $\mu$ g de plásmido e incubar 30 minutos a 37 °C.

2.- Purificación de la sonda: Precipitar con 25  $\mu$ l 4M CLi y 2,5 volúmenes de etanol, centrifugar 3 minutos a 15.000 rpm. Después eliminar el sobrenadante y lavar 2 veces con etanol 70%. Dejar secar los precipitados y redissolver en 400  $\mu$ l de agua tratada.

3.- Estimación del rendimiento de la sonda: La cantidad de transcrito recuperada después de la purificación se estima, después del revelado, por comparación con un DNA marcado testigo. En nuestra sonda el rendimiento obtenido es de 50 ng/ml.

#### **Equipo y material principal:**

- Juego de Micropipetas BIOHIT.
- Tubos Eppendorf.
- Incubadora.
- Centrífuga.

#### **Reactivos y tampones utilizados:**

- DTT
- RNasin (SIGMA).
- Dinucleótidos.
- Dinucleótidos marcados con Digoxigenina.
- Plasmido PBscribe.
- *DNaseI*.
- Tampón de transcripción de la RNA polimerasa SP6, T7 o T3.

## 3.2.- Hibridación molecular no radioactiva

### **Etapas del desarrollo de la técnica:**

1.- Preparación de las muestras: Primeramente se procedió a la homogenización de las muestras en *tampón de extracción fosfato y citrato*. Posteriormente estos extractos se depositaron (unos 5µl) sobre membranas de nylon. Se depositaron a una densidad de 1 muestra por cm<sup>2</sup>. Para la fijación de las muestras se dejaron las membranas 2 horas a una temperatura de 80 °C. Una vez fijadas pueden permanecer durante horas.

2.- Hibridación "dot-blot" con sondas marcadas con digoxigenina: Los ácidos nucleicos unidos a la membrana se hibridaron frente a la sonda de RNA marcada con digoxigenina en una *solución de hibridación* y a una dosis de 50 ng/ml durante 12 horas a 60 °C. La sonda fue sometida previamente durante dos minutos a una temperatura de 100 °C para facilitar su desnaturalización.

3.- Lavado de la membrana: Después se sometió la membrana a varios lavados de 10 minutos con *solución de lavado* a una temperatura de 65 °C.

4.- Revelado de la membrana: La detección de la hibridación se realizó mediante un procedimiento luminiscente aprovechando el desarrollo del color del sustrato correspondiente. Se sumergió la membrana primero en *solución de lavado I* durante 1 minuto y después 30 minutos en *solución de lavado II*. Posteriormente se incubó la membrana con sustrato luminiscente CSPD, a una dosis 1/100 en *solución de lavado III* durante 25 minutos. Después se expuso durante una hora a un film Kodak XAR a 37 °C y se reveló.

### **Equipo y material principal:**

- Juego de Micropipetas BIOHIT.
- Horno de hibridación TECHNE HB2-D.
- Membranas de nylon (BOEHRINGER & MANNHEIM).
- Película XAR (KODAK).

### **Reactivos y tampones utilizados:**

- Anticuerpos Antidigoxigenina marcados con marcador luminiscente (BOEHRINGER & MANNHEIM).
- Mezcla de marcaje "Labelling Mix" con sustrato luminiscente CSPD (BOEHRINGER & MANNHEIM).

- *Solución agua fisiológica tamponada* (AFT) (pH 7,2-7,4); para 1000 ml:

8,00 g	ClNa
0,20 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
2,90 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12H <sub>2</sub> O
0,20 g	ClK

- *Tampón de extracción fosfato*; para 1000 ml:

2,00 g	Dietilditiocarbamato sódico (DIECA).
20,0 g	Polivinil pirrolidona (PVP-10).
1.000 ml	AFT

- *Tampón de extracción citrato* (pH 8,5).

50 mM	Citrato sódico
5 mM	EDTA

- *Tampón 1 X SSC* (pH 7.0).

0,15 M	NaCl
0,015 M	Citrato trisódico.

- *Solución de hibridación.*

50%	Formamida Desionizada (BOEHRINGER & MANNHEIM).
2%	Blocking reagent (BOEHRINGER & MANNHEIM).
0,1%	N-lauroylsarcosine.
0,02%	SDS (MERCK).
Disuelto en <i>Tampón 20 X SSC</i> .	

- *Solución de Lavado I.*

0,1 M	Tris-HCl (pH 7,5)
0,1 M	NaCl
0,002 M	MgCl <sub>2</sub>
0,05%	Triton

- *Solución de Lavado II.*

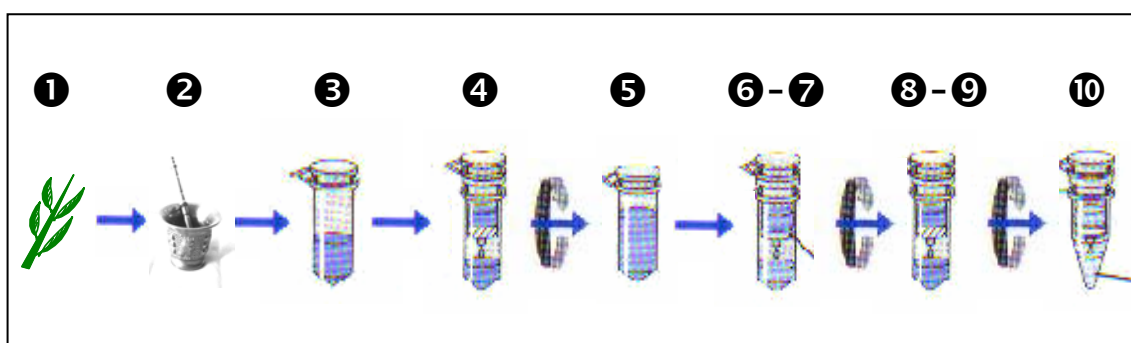
1%	Blocking reagent (BOEHRINGER & MANNHEIM).
<i>Disuelto en solución de lavado I</i>	

- *Solución de Lavado III.*

0,1 M	Tris-HCl (pH 7,5)
0,1 M	NaCl
0,005 M	MgCl <sub>2</sub>

**ANEXO 4: Extracción de ARN con Kit Qiagen®****Etapas del desarrollo de la técnica:**

- 1.- Tomar de 50 a 100 mg (fresco o congelado) de material vegetal.
- 2.- Triturado en nitrógeno líquido en tubos eppendorf de 2 ml. No descongelar la muestra.
- 3.- Añadir 450 µl de Buffer RLT (Tampón de lisis). Agitación muy fuerte unos 15 segundos.
- 4.- Tomar todo lo que podamos del paso anterior y pasar a la columna (lila) para limpiar la muestra, dejando pasar los ácidos nucleicos, centrifugando 2 minutos a máxima velocidad. Pasar el sobrenadante a un tubo de 2 ml.
- 5.- Añadir 0,5 volúmenes de Etanol (96-100) aproximadamente 225 µl y mezclar con la pipeta.
- 6.- Aplicar la muestra (aproximadamente) 650 µl incluyendo cualquier precipitado que se forme, poniéndolo en una nueva columna (rosa) que retiene los ácidos nucleicos. Centrifugar 15 segundos a 8.000g. Desechamos el sobrenadante y reutilizamos el tubo.
- 7.- Añadir 700 µl del tampón RW1 en la columna. Centrifugar 15 segundos a 8.000g. Desechamos el sobrenadante.
- 8.- Poner la columna en un nuevo tubo de 2 ml, pipetear 500 µl de tampón RPE en la columna. Centrifugar 15 segundos a 8.000g. Descargamos el sobrenadante.
- 9.- Añadir otros 500 µl de RPE a la columna y centrifugar 2 minutos a 8.000g. Desechamos el sobrenadante.
- 10.- Finalmente transferir la columna a un tubo de 1,5 ml. El ARN se eluye añadiendo de 30 a 50 µl de Agua Rnase-free y centrifugando 1 minuto a 8.000g.



## ANEXO 5: Técnica RT-PCR

### **Etapas del desarrollo de la técnica:**

1.- Extracción del ARN: Mediante el procedimiento del Anexo 4.

Con una muestra de 5 µl de solución y bromuro de etidio como colorante del ARN se procede a realizar una prueba del estado del ARN mediante una electroforesis en gel de agarosa (1%) en TBE (Trisclorhídrico, Ácido Bórico, EDTA).

2.- Transcripción inversa del ARN: Para la transcripción del ARN a ADNc para su posterior amplificación se utilizó la transcriptasa inversa. Se tomaron 4 µl de solución junto 9 µl de agua y 2,5 µl del oligonucleótido empleado como cebador antisentido en la PCR. Se colocó 3 minutos a 85 °C y posteriormente se incubó 25 minutos a 50 °C para favorecer la linealización del ARN y la adhesión de los oligonucleótidos.

A continuación, se añadieron 4 µl de tampón AMV, 0,5 µl de inhibidor RNAsa, 0,2 µl de enzima transcriptasa inversa (2 unidades/ tubo) y 1 µl de dinucleótidos (25 mM). Se incubó la mezcla de reacción a 42 °C durante 45 minutos para que se produjera la transcripción inversa y posteriormente se colocó 3 minutos a 90 °C para eliminar la enzima restante AMV.

3.- Amplificación de la cadena de ADNc: El ADNc sintetizado a partir de la región de ARN viral que fue transcrito, posteriormente se amplificó en un termociclador. Se utilizaron dos oligonucleótidos, uno en sentido directo y otro en sentido inverso, que se encuentran en los extremos de una región de ARN que codifica la proteína de la cápsida.

Para la amplificación del ADNc mediante PCR se preparó la siguiente mezcla de reacción:

3 µl de muestra de ADNc	5 µl de <i>tampón de la polimerasa</i>
3 µl de MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1 µl de cada uno de los cebadores (100 mM)
1 µl de dNTPs (25 mM)	0,2 µl de polimerasa (1 u/tubo)
36 µl de agua miliQ	

Esta mezcla de reacción se sometió a diferentes ciclos de amplificación en el termociclador con diferentes programas según los cebadores utilizados.

- Cebadores P1-P2: un ciclo a 92 °C durante 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de 92 °C 20 segundos, 62 °C 20 segundos y 72 °C 40 segundos, finalizando con 10 minutos a 72 °C.

- Cebadores VP337-VP338: un ciclo a 94 °C durante 2 minutos, seguidos de 30 ciclos de 94 °C 30 segundos, 55 °C 30 segundos y 72 °C 30 segundos, finalizando con 5 minutos a 72 °C.

4.- Visualización de resultados: Después de la amplificación, las muestras son analizadas en un gel de azarosa al 1% (en TBE). Se deposita una alícuota de 5 µl de muestra junto con 2 µl de bromuro de etidio en cada pocillo del gel y se realiza la electroforesis a 90 voltios durante 30 minutos.

### **Equipo y material principal:**

- Juego de Micropipetas BIOHIT.
- Tubos Eppendorf.
- Termociclador Mastercycler® gradient de Eppendorf.
- Aparato de electroforesis: Cubeta de metacrilato y fuente de alimentación.
- Película de Rayos X (AMERSAN).
- Cámara fotográfica (POLAROID 667).
- Transiluminador de Rayos X.

### **Reactivos y tampones utilizados:**

- Transcriptasa inversa AMV (PROMEGA)
- Tampón AMV (10x) (PROMEGA)
- Polimerasa (EPICENTRE THECNOLOGIES)
- Tampón de la polimerasa (20x) (BIOTOOLS)
- DiNucleótidos (dNTPs 2 mM) (BIOTOOLS).
- ClMg<sub>2</sub> (50 mM)
- Oligonucleótidos empleados como cebadores (P1, P2, VP337, VP338) (GIBCO BRL TECHNOLOGIES).
- *Tampón de extracción*

100 mM	Tris-ClH, pH 8
10 mM	EDTA
1%	SDS
100 mM	LiCl



## **ANEXO 6: Inmunoimpresión para la localización de la proteína del virus**

### **Etapas del desarrollo de la técnica:**

- 1.- Impresión de las muestras: Para la realización de las secciones transversales se utilizan cuchillas y se realiza un corte perpendicular al tallo, peciolo o raíz, presionando directamente sobre la membrana durante unos 5 segundos aproximadamente. Sobre vidrio se coloca la membrana de nitrocelulosa de un tamaño de 4x5 cm y se presiona la superficie objeto del estudio lo más homogéneamente posible, evitando desplazamientos.
- 2.- Fijación de las muestras: Se dejaron las membranas 1 hora a una temperatura de 80 °C. Una vez fijadas las muestras, las membranas pueden conservarse durante meses.
- 3.- Aclarado: Posteriormente se procede al aclarado de la membrana con una *solución AFT* durante unos 10 minutos.
- 4.- Bloqueo de la membrana: Consiste en la incubación con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente, de la membrana de nitrocelulosa en una solución de BSA (BOEHRINGER & MANNHEIM) al 3% en *solución AFT*. Si se desea, esta incubación se puede llevar a cabo a 4 °C durante 16 horas.
- 5.- Adición del anticuerpo primario: Consiste en la adición de los anticuerpos monoclonales en una proporción de 0,1 µg/ml de *solución de incubación*. La incubación se realiza en agitación a 37 °C de temperatura durante 2 horas.
- 6.- Lavado: Después se realizan 3 lavados de 5 minutos cada uno, en una *solución de lavado*.
- 7.- Adición de inmunoglobulinas anti-ratón conjugadas con fosfatasa alcalina: Consiste en la adición de inmunoglobulinas conjugadas con fosfatasa alcalina como anticuerpo secundario. Los anticuerpos secundarios se aplican en una concentración de 0,1 µg/ml de *solución de incubación*, incubándose a 37 °C de temperatura durante 2 horas en agitación.
- 8.- Lavado: Después se realizan 3 lavados de 5 minutos cada uno, en una *solución de lavado*.
- 9.- Revelado de la membrana: Para el revelado se añade la solución de sustrato colorimétrico 'BM Purple AP Substrate' hasta que aparezca el color (10-20 minutos). Posteriormente se retira la solución y la membrana se lava con agua destilada. La observación de la membrana se realiza mediante lupa binocular y microscopio óptico.

**Equipo y material principal:**

- Membranas de nitrocelulosa de 0,45 micras de microporo (SCHLEICHER & SCHUELL, nº BA85).
- Juego de Micropipetas BIOHIT.
- Bisturí, pinzas y portaobjetos de vidrio.
- Horno de hibridación AMERSHAN LIFE SCIENCE.
- Microscopio OLYMPUS BH2.
- Lupa NIKON SMZ-1.

**Reactivos y tampones utilizados:**

- Inmunoglobulinas policlonales de conejo anti-PPV (REAL-DURVIZ).
- Anticuerpos monoclonales específicos de PPV (5B-IVIA) (REAL-DURVIZ).
- Anticuerpos monoclonales (5B-IVIA) marcados con fosfatas alcalina (REAL-DURVIZ).
- Inmunoglobulinas de cabra anti-ratón marcadas con fosfatasa alcalina (REAL-DURVIZ).
- Sustrato colorimétrico BM Purple AP Substrate, pricipitating (Roche).
- *Solución agua fisiológica tamponada* (AFT) (pH 7,2-7,4) para 1.000 ml:

8,00 g	ClNa
0,20 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
2,90 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12H <sub>2</sub> O
0,20 g	ClK
- *Solución de lavado* para 1.000ml:

0,5 ml	Tween 20 (SIGMA)
1.000 ml	AFT
- *Solución de incubación* para 1.000ml:

5 g	BSA
1.000 ml	AFT

## **ANEXO 7: Impresión para la localización del ácido nucleico del virus**

### **Etapas del desarrollo de la técnica:**

1.- Impresión de las muestras: De forma similar a la inmunopresión en membranas de nitrocelulosa, con una cuchilla se realiza un corte perpendicular al órgano a estudiar (tallo o pecíolo). Entonces la muestra se presiona sobre la membrana de nylon durante unos 5 segundos.

2.- Fijación de las muestras: La membrana con las impresiones se sometió durante 3 minutos a luz ultravioleta. Una vez fijados los ácidos nucleicos, se puede conservar la membrana durante meses.

3.- Preparación de la membrana: Se coloca la membrana en un baño a 68 °C en agitación con el tampón de hibridación durante 1 hora, retirándolo posteriormente.

4.- Construcción de la sonda: La construcción de la sonda marcada con digoxigenina se realizó de forma similar a la descrita anteriormente en la hibridación molecular no radioactiva (ANEXO 3).

5.- Hibridación dot-blot con sondas marcadas con digoxigenina: La sonda se incubó previamente durante varios minutos a 100 °C para facilitar su desnaturalización. Los ácidos nucleicos unidos a la membrana se hibridaron con la sonda de ARN marcada con digoxigenina en el tampón de hibridación durante 12 horas a 68 °C. Después se sometió a varios lavados con distintas *Soluciones de lavado*, primero a 68 °C (*Solución I*) y posteriormente a temperatura ambiente (*Solución II y III*).

6.- Revelado quimiluscente de la membrana: El primer revelado de la membrana se realizó mediante un procedimiento luminiscente (Más y Pallás, 1995; Pallás *y col.*, 1997). La membrana se incubó con el sustrato luminiscente CSPD durante 25 minutos. Después se expuso durante 1 hora a una película Kodak XAR a 37 °C y se reveló. En las muestras enfermas aparece una mancha en la película indicativa de la presencia del virus, aunque no es posible observar la localización en los tejidos. Para esta localización se procede al revelado colorimétrico.

7.- Revelado colorimétrico de la membrana: Para el revelado colorimétrico (Más y Pallás, 1995; Pallás *y col.*, 1997) se añadió la solución de sustrato colorimétrico 'BM Purple AP substrate' hasta que apareció el color púrpura en los testigos enfermos de *Nicotiana* (10-20 minutos). Entonces se retiró la solución y se lavó la membrana con agua destilada. La observación se realizó mediante lupa binocular y microscopio óptico.

**Equipo y material principal:**

- Juego de Micropipetas BIOHIT.
- Membranas de nylon (BOEHRINGER & MANNHEIM).
- Bisturí, pinzas y portaobjetos de vidrio.
- Horno de hibridación TECHNE HB2-D.
- Microscopio OLYMPUS BH2.
- Lupa NIKON SMZ-1.

**Reactivos y tampones utilizados:**

- Anticuerpos Antidigoxigenina marcados con marcador luminiscente (BOEHRINGER & MANNHEIM).
- Mezcla de marcaje "Labelling Mix" con sustrato luminiscente CSPD (BOEHRINGER & MANNHEIM).
- Sustrato colorimétrico BM Purple AP Substrate, precipitating (Roche).

- *Tampón 1 X SSC* (pH 7,0).

0,15 M	NaCl
0,015 M	Citrato trisódico.

- *Solución de hibridación.*

50%	Formamida Desionizada (BOEHRINGER & MANNHEIM).
2%	Blocking reagent (BOEHRINGER & MANNHEIM).
0,1%	N-lauroylsarcosine.
0,02%	SDS (MERCK).
Disuelto en <i>Tampón 20 X SSC</i> .	

- *Solución de Lavado I.*

0,1 M	Tris-HCl (pH 7.5)
0,1 M	NaCl
0,002 M	MgCl <sub>2</sub>
0,05%	Triton

- *Solución de Lavado II.*

1%	Blocking reagent (BOEHRINGER & MANNHEIM).
<i>Disuelto en solución de lavado I</i>	

- *Solución de Lavado III.*

0,1 M	Tris-HCl (pH 7.5)
0,1 M	NaCl
0,005 M	MgCl <sub>2</sub>

## ANEXO 8. Optimización del cultivo en invernadero

**Anexo 8.1:** Injerta número 1, mayo de 2003. Número de patrones infectados sobre el total inoculado. Entre paréntesis intensidad media de síntomas. Número de variedades con síntomas sobre el total de los brotados e inoculados efectivamente.

Patrón	Variedad	Ciclo 1		Ciclo 2		Ciclo 3		Ciclo 4	
		Patrón	Variedad	Patrón	Variedad	Patrón	Variedad	Patrón	Variedad
<i>Inóculo en el patrón</i>									
GF305	GF305	9/10 (3,1)	7/7 (3,1)	5/6 (2,3)	5/5 (2,8)	5/6 (1,8)	3/5 (1,0)	5/6 (2,6)	2/5 (3,0)
	Real Fino	6/10 (3,5)	3/6 (3,3)	2/4 (4,0)	1/2 (2,0)	4/6 (2,2)	2/4 (1,0)	4/4 (3,5)	0/4 (0,0)
	SEO	9/10 (2,9)	0/7 (0,0)	4/6 (3,5)	0/4 (0,0)	5/5 (2,0)	0/5 (0,0)	5/5 (3,4)	0/5 (0,0)
Real Fino	GF305	3/8 (1,7)	4/3 (2,5)	3/5 (2,3)	3/3 (3,0)	3/5 (1,3)	2/3 (1,0)	3/5 (1,7)	3/3 (2,7)
	Real Fino	5/10 (2,6)	3/5 (3,3)	7/9 (2,4)	5/7 (2,2)	5/8 (1,5)	1/5 (1,0)	3/7 (2,7)	1/3 (1,0)
	SEO	9/10 (3,0)	0/8 (0,0)	8/8 (2,7)	0/8 (0,0)	7/8 (2,1)	0/7 (0,0)	7/7 (2,1)	0/7 (0,0)
<i>Inóculo en la variedad</i>									
GF305	GF305	—	—	1/2 (4,0)	2/8 (3,5)	1/0 (1,0)	0/0 (0,0)	0/1 (0,0)	1/2 (0,0)
	Real Fino	—	—	0/0 (0,0)	0/7 (0,0)	2/0 (3,0)	0/6 (0,0)	2/1 (4,0)	1/2 (1,0)
	SEO	—	—	0/0 (0,0)	0/6 (0,0)	0/0 (0,0)	0/4 (0,0)	0/0 (0,0)	0/2 (0,0)
Real Fino	GF305	—	—	3/4 (2,6)	4/7 (2,5)	1/2 (1,5)	2/6 (1,0)	3/5 (2,7)	5/8 (2,0)
	Real Fino	—	—	1/1 (2,0)	1/8 (2,0)	1/0 (3,0)	0/8 (0,0)	1/1 (3,0)	1/6 (1,0)
	SEO	—	—	0/0 (0,0)	0/5 (0,0)	0/0 (0,0)	0/5 (0,0)	0/0 (0,0)	0/4 (0,0)

**Anexo 8.2:** Injerta número 2, septiembre de 2003. Número de patrones infectados sobre el total inoculado. Entre paréntesis intensidad media de síntomas. Número de variedades con síntomas sobre el total de los brotados e inoculados efectivamente.

Patrón	Variedad	Ciclo 1		Ciclo 2		Ciclo 3		Ciclo 4	
		Patrón	Variedad	Patrón	Variedad	Patrón	Variedad	Patrón	Variedad
<i>Inóculo en el patrón</i>									
GF305	GF305	6/6 (2,5)	2/3 (2,0)	4/4 (2,5)	2/4 (1,0)	4/4 (2,5)	2/4 (1,0)	—	—
	Real Fino	6/7 (3,5)	2/4 (1,0)	2/3 (2,5)	0/2 (0,0)	1/2 (3,0)	1/1 (1,0)	0/2 (0,0)	0/0 (0,0)
	SEO	6/6 (3,5)	0/4 (0,0)	2/2 (3,5)	0/1 (0,0)	1/1 (4,0)	0/1 (0,0)	0/1 (0,0)	0/0 (0,0)
Real Fino	GF305	4/8 (1,7)	2/6 (1,0)	2/6 (1,0)	1/2 (2,0)	1/1 (1,0)	0/0 (0,0)	—	—
	Real Fino	1/3 (1,0)	0/3 (0,0)	0/2 (0,0)	0/0 (0,0)	1/1 (4,0)	1/1 (1,0)	—	—
	SEO	2/3 (1,5)	0/2 (0,0)	2/2 (1,5)	0/2 (0,0)	1/1 (1,0)	0/1 (0,0)	1/1 (2,0)	0/1 (0,0)
<i>Inóculo en la variedad</i>									
GF305	GF305	—	—	0/0 (0,0)	0/3 (0,0)	2/0 (2,0)	0/4 (0,0)	0/0 (0,0)	0/1 (0,0)
	Real Fino	—	—	0/0 (0,0)	0/1 (0,0)	1/0 (0,0)	0/1 (0,0)	0/0 (0,0)	0/1 (0,0)
	SEO	—	—	0/0 (0,0)	0/1 (0,0)	0/0 (0,0)	0/1 (0,0)	—	—
Real Fino	GF305	—	—	0/1 (0,0)	1/5 (1,0)	0/1 (0,0)	1/1 (2,0)	—	—
	Real Fino	—	—	0/0 (0,0)	0/2 (0,0)	0/0 (0,0)	0/1 (0,0)	—	—
	SEO	—	—	0/0 (0,0)	0/1 (0,0)	0/0 (0,0)	0/2 (0,0)	0/0 (0,0)	0/1 (0,0)

**Anexo 8.3:** Injerta número 3, mayo de 2004. Número de patrones infectados sobre el total inoculado. Entre paréntesis intensidad media de síntomas. Número de variedades con síntomas sobre el total de los brotados e inoculados efectivamente.

Patrón	Variedad	Ciclo 1		Ciclo 2		Ciclo 3		Ciclo 4	
		Patrón	Variedad	Patrón	Variedad	Patrón	Variedad	Patrón	Variedad
<i>Inóculo en el patrón</i>									
GF305	GF305	8/10 (2,2)	0/2 (0,0)	2/2 (3,0)	0/2 (0,0)	1/2 (1,0)	0/1 (0,0)		
	Real Fino	9/10 (3,0)	1/4 (1,0)	6/6 (3,3)	2/4 (2,5)	0/2 (0,0)	0/0 (0,0)		
	SEO	9/10 (2,8)	0/5 (0,0)	9/9 (2,7)	0/9 (0,0)	5/7 (3,4)	0/5 (0,0)		
Real Fino	GF305	10/10 (3,8)	4/4 (3,2)	6/6 (3,0)	2/6 (1,0)	2/4 (2,0)	0/2 (0,0)		
	Real Fino	8/10 (3,4)	5/6 (3,2)	9/9 (3,0)	4/7 (2,0)	3/6 (1,7)	1/3 (2,0)		
	SEO	7/9 (2,8)	0/5 (0,0)	8/9 (2,7)	1/8 (1,0)	3/7 (3,0)	0/3 (0,0)		
<i>Inóculo en la variedad</i>									
GF305	GF305	—	—	1/2 (2,0)	2/2 (1,0)	1/0 (3,0)	--		
	Real Fino	—	—	3/3 (2,0)	3/6 (1,0)	5/0 (2,2)	0/6 (0,0)		
	SEO	—	—	0/0 (0,0)	0/5 (0,0)	1/0 (1,0)	0/3 (0,0)		
Real Fino	GF305	—	—	0/0 (0,0)	0/1 (0,0)	—	—		
	Real Fino	—	—	0/0 (0,0)	0/4 (0,0)	0/0 (0,0)	0/4 (0,0)		
	SEO	—	—	0/0 (0,0)	0/1 (0,0)	0/0 (0,0)	0/1 (0,0)		

**Anexo 8.4:** Injerta número 4, septiembre de 2004. Número de patrones infectados sobre el total inoculado. Entre paréntesis intensidad media de síntomas. Número de variedades con síntomas sobre el total de los brotados e inoculados efectivamente.

		Ciclo 1		Ciclo 2		Ciclo 3		Ciclo 4	
Patrón	Variedad	Patrón	Variedad	Patrón	Variedad	Patrón	Variedad	Patrón	Variedad
<i>Inóculo en el patrón</i>									
GF305	GF305	10/10 (2,6)	9/9 (2,4)	10/10 (3,6)	3/8 (1,3)				
	Real Fino	10/10 (3,2)	2/3 (1,5)	0/2 (0,0)	0/0 (0,0)				
	SEO	10/10 (2,9)	0/5 (0,0)	4/4 (3,0)	0/4 (0,0)				
Real Fino	GF305	10/10 (4,1)	10/10 (2,6)	4/8 (2,7)	2/4 (1,0)				
	Real Fino	9/10 (3,4)	5/6 (2,4)	6/7 (2,0)	0/4 (0,0)				
	SEO	10/10 (3,4)	0/6 (0,0)	6/6 (2,3)	0/6 (0,0)				
<i>Inóculo en la variedad</i>									
GF305	GF305	—	—	0/0 (0,0)	0/9 (0,0)				
	Real Fino	—	—	1/6 (2,0)	0/6 (0,0)				
	SEO	—	—	0/0 (0,0)	0/7 (0,0)				
Real Fino	GF305	—	—	0/0 (0,0)	0/8 (0,0)				
	Real Fino	—	—	1/0 (1,0)	0/5 (0,0)				
	SEO	—	—	0/0 (0,0)	0/3 (0,0)				



