

AVANCES EN EL CONOCIMIENTO DE LOS VIROIDES COMO PATOGENOS DE FRUTALES DE HOJA CADUCA.

R. Flores
C. Hernández
IATA (CSIC)
Jaime Roig, 11
46010 Valencia
España

J.C. Desvignes
CTIFL
Lanxade
24130 La Force
Francia

G. Llácer*
IVIA
Apartado Oficial
46113 Moncada
(Valencia)
España

Resumen

Se ha demostrado que dos enfermedades de frutales de hoja caduca, el mosaico latente del melocotonero (PLM) y los chancros pustulosos del peral (PBC), hasta ahora atribuidas a virus, están realmente producidas por viroides. El PLM es una enfermedad grave, que se transmite por pulgones (al menos por Myzus persicae), que afecta a un gran número de las variedades americanas de melocotonero que se cultivan en España y que, en cambio, no se ha encontrado hasta ahora en variedades españolas. El PBC no es una enfermedad grave, ya que es latente en la mayoría de variedades de peral, pero el descubrimiento de su etiología viroidal podría facilitar el estudio de otras enfermedades similares de peral, mucho más graves, ya que afectan de forma específica a variedades importantes.

Un tercer viroide, el del enanismo del lúpulo, ha sido encontrado en variedades españolas de melocotonero y albaricoquero, aunque no ha sido asociado por ahora a ninguna enfermedad.

Palabras clave: melocotonero, peral, mosaico, chancros, RNA, electroforesis, infectividad.

Abstract

Advances in the knowledge of viroids as deciduous fruit tree pathogens.

It was demonstrated that two deciduous fruit tree diseases, peach latent mosaic (PLM) and pear blister canker (PBC), so far attributed to viruses, are actually produced by viroids. PLM is a severe disease that is transmitted by aphids (at least by Myzus persicae) that affects a large number of American peach varieties that are grown in Spain, which, conversely, so far have not been found in Spanish varieties. PBC is not a serious disease, since it is latent in the most part of varieties of pear, but the discovery of their viroidal etiology could facilitate the study of other similar diseases of pear trees, far more severe since they affect specifically important varieties.

A third viroid is hop stunt and has been found in Spanish varieties of peach and apricot, although for the moment has not been associated to any other disease.

Key words: peach, pear, mosaic, cankers, RNA, electrophoresis, infectivity.

1. Introducción

Hace poco más de 20 años que se descubrió un nuevo tipo de agente patógeno de las plantas: los viroides (Diener, 1971; Semancik y Weathers, 1972). Los viroides representan la forma más elemental de parasitismo. Están constituidos por un simple ácido ribonucleico (RNA), circular, muy pequeño y sin proteína de cápsida, pero capaz de replicación autónoma en células susceptibles. Además de su interés en el campo de la biología fundamental, ya que son los únicos sistemas subvirales conocidos hoy en día, los viroides son agentes fitopatógenos importantes. Son responsables de enfermedades en diferentes especies cultivadas, tanto herbáceas (patata, tomate, pepino, crisantemo, lúpulo) como leñosas (cítricos, palmera, aguacate, vid).

Hasta 1982 no se tuvieron las primeras sospechas de que una enfermedad de un frutal de hoja caduca, la piel cicatrizada de la manzana (hasta entonces atribuida a virus), pudiera estar asociada a un RNA tipo viroide (Koganezawa et al., 1982), aunque la prueba definitiva de que un viroide era el agente causal de dicha enfermedad necesitó todavía 5 años más (Hashimoto y Koganezawa, 1987).

En 1988, los autores de la presente comunicación empezaron a colaborar en el estudio de varias enfermedades de frutales de hoja caduca que, como la piel cicatrizada de la manzana, se habían atribuido a virus, a falta de una hipótesis mejor, aunque nunca se había podido aislar el agente patógeno. Las enfermedades elegidas fueron, en primer lugar, el mosaico latente del melocotonero ("peach latent mosaic", PLM) y, a continuación, los chancros pustulosos del peral ("pear blister canker", PBC), cuyos agentes patógenos tienen en común el ser muy termoestables (las infecciones son difíciles o imposibles de eliminar por termoterapia), una propiedad típica de los viroides.

PLM fue identificado y descrito inicialmente en Francia (Desvignes, 1976, 1980). Se ha detectado en el 20% de las variedades americanas de melocotonero y en el 60% de las procedentes del Japón. La mayor parte de las veces las infecciones no producen síntomas en el indicador melocotonero de semilla GF-305 en invernadero, de donde el nombre de "latente". Sin embargo, estas infecciones latentes producen los siguientes síntomas en las variedades comerciales cultivadas en el campo: retrasos de 4 a 6 días en la floración, brotación y maduración; frutos de forma

irregular, decolorados y con grietas en la sutura; envejecimiento rápido de los árboles a partir del quinto año (necrosis de yemas, follaje escaso). Algunas cepas "marcadoras" inducen síntomas de mosaico en hojas, lo que se aprovecha para los bioensayos de rutina con GF-305 en invernadero. Los bioensayos se basan en el efecto de protección cruzada entre las cepas latentes y una cepa marcadora. Esta última sólo produce mosaico cuando la cepa latente está ausente (Desvignes, 1980, 1986).

Varias enfermedades asociadas con alteraciones de la corteza en peral han sido descritas en Europa y USA. Entre ellas, el PBC fue identificado primeramente por Cropley (1960) en las variedades de peral Comice, Laxton's Superb y Williams. Alrededor del 5% de las variedades de peral están infectadas, aunque la mayoría son tolerantes, es decir, no expresan síntomas. En el caso del PBC, sólo la transmisión por injerto sobre el peral indicador A-20 permite ponerla en evidencia. Dos o tres años después de su inoculación en vivero, empiezan a aparecer grietas en la corteza, que luego se descama y da lugar a la formación de chancros. El vigor se va reduciendo hasta que la planta muere. Las hojas y los frutos no muestran ningún síntoma (Desvignes et al., 1992).

En esta comunicación se resumen parte de los trabajos sobre estas dos enfermedades efectuados por los autores en los últimos 5 años.

2. Material y métodos

Los materiales utilizados para estudiar la posible asociación del PLM con un RNA tipo viroide fueron:

- a) Hojas jóvenes de melocotoneros de semilla GF-305 inoculados por injerto con una cepa marcadora o con una cepa latente (detectada mediante bioensayo). Las plantas estaban cultivadas en maceta, en invernaderos de Moncada o Lanxade.
- b) Hojas jóvenes de melocotoneros GF-305, cultivados de igual forma, pero que no habían sido nunca inoculados (libres de toda infección).
- c) Hojas jóvenes y, a veces, frutos jóvenes de melocotoneros de distintas variedades comerciales, cultivados en una parcela experimental de Lanxade, que mostraban los síntomas típicos de la enfermedad.
- d) Hojas y frutos jóvenes de árboles de las mismas variedades, que habían podido ser saneados por termoterapia (ausencia de síntomas y bioensayos negativos).

Los materiales utilizados para estudiar la posible asociación del PBC con un RNA tipo viroide fueron:

- e) Hojas de perales A-20 inoculados por injerto con

diversos clones de peral que inducían en este indicador los síntomas típicos de PBC. Las plantas de A-20 estaban cultivadas en parcelas experimentales de Lanxade y Zaragoza. Algunos de los clones de peral estaban infectados solamente por aislados de PBC, otros estaban además infectados por virus ("pear vein yellows" y "pear ring pattern mosaic").

f) Hojas de perales A-20 de las mismas parcelas, pero que no habían sido nunca inoculados (libres de toda infección).

Los materiales de todos los grupos (a-f) fueron sometidos a la extracción y purificación parcial de ácidos nucleicos, según el método descrito por Flores y Llácer (1988). A continuación, los ácidos nucleicos extraídos fueron sometidos a dos ciclos de electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), siguiendo el método de Flores et al. (1990).

La infectividad de las preparaciones purificadas de ácidos nucleicos fue ensayada mediante varios tipos de inoculación mecánica: cortes múltiples en el tallo con una cuchilla bañada en el inóculo, frotamiento de hojas previamente espolvoreadas con carborundo y un proceso que simula un injerto (introducción bajo la corteza del tallo de una pequeña pieza de papel secante embebida en el inóculo). La técnica de los cortes múltiples se aplicó a melocotoneros GF-305 (con inóculo procedente de plantas con PLM), a perales de semilla Fieudière (con inóculo procedente de plantas con PBC) y a Gynura aurantiaca DC y Chrysanthemum morifolium Ramat (con ambos inóculos). El frotamiento de hojas se aplicó, también con ambos inóculos, a Lycopersicon esculentum Mill. (Rutgers) y a Cucumis sativus L. (Suyo). El injerto simulado se aplicó solamente a perales de semilla Fieudière con inóculo procedente de plantas con PBC. Un año después de la inoculación con cortes múltiples, los perales de semilla se injertaron directamente con yemas del indicador A-20. Los perales de semilla inoculados con el injerto simulado se utilizaron en un bioensayo convencional de doble injerto en vivero (una yema del indicador A-20 y otra yema de la planta que se quiere analizar se injertan simultáneamente sobre peral de semilla).

Otros trabajos realizados, en el caso del PLM, han sido:

- Ensayos de transmisión por pulgones, utilizando melocotoneros de semilla GF-305 como donantes y receptores, Myzus persicae, Aphis spiraecola y Aphis gossypii como vectores y la técnica de transmisión descrita por Hermoso de Mendoza et al. (1984).

- Estudio de la incidencia de la enfermedad en variedades americanas de melocotonero, cultivadas en plantaciones comerciales del área de Valencia, y en variedades españolas de carne dura, cultivadas en abrigo de cuarentena en Moncada. Parte de estos melocotoneros de carne dura estaban infectados por "prunus necrotic ring spot virus" y

"chlorotic leaf spot virus" y el resto estaban libres de virus (obtenidos por microinjerto de ápices caulinares in vitro, Juárez et al., 1988).

- Determinación de la distribución del agente causal dentro de las plantas infectadas.

Para los 2 últimos puntos se compararon dos métodos de detección: el bioensayo mencionado en la introducción (Desvignes, 1976) y la electroforesis (PAGE) descrita por Flores et al. (1990). Para el estudio de la distribución se analizaron hojas y corteza de brotes jóvenes y de ramas viejas, raíces, frutos y semillas.

3. Resultados y discusión

El análisis por PAGE de las preparaciones de ácidos nucleicos procedentes de los grupos a), c) y e) mostró la presencia de dos RNAs tipo viroide. El RNA correspondiente a los dos primeros grupos se situaba entre los viroides de la exocortis de los cítricos (CEVd, 371 bases) y del enanismo del lúpulo (HSVd, 297 bases), muy cerca de la posición del viroide de la piel cicatrizada de la manzana (ASSVd, 330 bases). El RNA correspondiente al grupo e) se situaba entre el ASSVd y el HSVd. Estos RNAs tipo viroide estaban ausentes en las preparaciones de ácidos nucleicos procedentes de los grupos b), d) y f). Quedaba así demostrada la asociación de las dos enfermedades, PLM y PBC, con dos RNAs tipo viroide distintos (Flores y Llácer, 1988; Flores et al., 1990, 1991).

Las pruebas de infectividad dieron los siguientes resultados:

- El RNA asociado al PLM (grupos a y c) fue capaz de infectar a 5 de las 11 plantas de melocotonero GF-305 inoculadas mecánicamente. En 2 de ellas se reprodujeron los síntomas típicos de mosaico, en las otras 3 la infección fue latente, pero se comprobó por bioensayo. De las 2 plantas con síntomas pudo recuperarse un RNA con las mismas propiedades electroforéticas que las del RNA utilizado como inóculo. En consecuencia este RNA podía ya ser llamado el viroide del mosaico latente el melocotonero (PLMVd) (Flores et al., 1990).

- Todos los intentos de transmitir mecánicamente PLMVd a algunas plantas herbáceas que son huéspedes típicos de viroides dieron resultados negativos (Flores et al., 1990).

- El RNA asociado al PBC (grupo e) fue capaz de infectar a los 5 grupos de 2 perales de semilla cada uno inoculados con la técnica de los cortes múltiples y a 3 de los 10 grupos de 3 perales de semilla cada uno inoculados con la técnica del injerto simulado. En todos los casos, la infección se comprobó porque 9-10 meses después de la

inoculación pudo recuperarse un RNA de las mismas características del utilizado como inóculo (Flores et al., 1991). El peral indicador A-20 injertado directamente sobre los perales de semilla infectados creció escasamente, se defolió y murió al año siguiente. El bioensayo convencional de doble injerto en vivero permitió reproducir los chancros típicos del PBC dos años después de la inoculación. Quedaba demostrado, por tanto, que el RNA asociado al PBC era el agente causal de la enfermedad y podía ser llamado el viroide de los chancros pustulosos del peral (PBCVd).

- PBCVd se transmitió mecánicamente a pepino, donde indujo síntomas muy ligeros (hojas rugosas), pero no se transmitió a ninguna de las otras plantas herbáceas inoculadas (Flores et al., 1991; Hernández et al., 1992).

Los ensayos de transmisión por pulgones de PLMVd dieron resultados positivos con Myzus persicae (1 planta infectada de 20 ensayadas), confirmando los resultados de Desvignes (1986). Los ensayos con A. spiraecola y A. gossypii no han proporcionado de momento resultados concluyentes (Flores et al., 1992).

De los 50 melocotoneros analizados en el área de Valencia (pertenecientes a 10 variedades americanas), 44 (88%) estaban infectados por PLMVd. Sólo 4 variedades de las 10 presentaron algún árbol libre del viroide. Con los dos métodos de detección ensayados se obtuvieron resultados casi totalmente coincidentes. PAGE es mucho más rápido aunque algo menos sensible que el bioensayo (Flores et al., 1992). PLMVd se distribuye muy bien en los diferentes órganos de la planta: raíces, ramas viejas, brotes jóvenes, hojas y frutos. Sólo en las semillas no se ha podido encontrar el viroide, lo que está de acuerdo con la falta de transmisión por semilla descrita previamente por Desvignes (1986).

En ninguno de los melocotoneros de carne dura analizados (pertenecientes a 6 variedades españolas) se ha encontrado PLMVd. Sin embargo, en casi todas estas plantas se ha detectado (por PAGE) la presencia de un RNA perteneciente al grupo del viroide del enanismo del lúpulo (HSVd), tanto en los melocotoneros infectados por virus como en los libres de virus (Flores et al., 1990, 1992). En el Japón, una enfermedad del melocotonero ("dapple peach") ha sido atribuida al HSVd (Sano et al., 1989). En España, en cambio, la presencia de HSVd en melocotonero no ha sido asociada por ahora a ninguna enfermedad. Lo mismo ocurre en albaricoquero, donde se ha detectado HSVd en las variedades Rojo de Carlet y Búlida, con y sin síntomas de viruela (Desvignes et al., 1992). Por tanto, el posible papel del HSVd en variedades españolas de melocotonero y albaricoquero está todavía por determinar.

El descubrimiento de la etiología viroidal del PLM y del PBC, enfermedades hasta ahora atribuidas a virus, permitirá un rápido desarrollo de los estudios sobre las mismas. En

especial, el conocimiento reciente de la naturaleza química de los viroides ha servido para poner a punto técnicas bioquímicas de detección (electroforesis, hibridación molecular, amplificación del DNA complementario) que son mucho más rápidas que los bioensayos tradicionales, basados en la transmisión por injerto a plantas indicadoras. El PLM es una enfermedad grave, pero de síntomas poco específicos, por lo que se confunde fácilmente con problemas inducidos por otras causas. Es, además, epidémica y se encuentra con frecuencia en variedades que vienen del extranjero. De ahí la importancia de contar con métodos rápidos de detección. El PBC no es una enfermedad grave, ya que es latente sobre la mayoría de variedades. Sin embargo, existen otras enfermedades en peral con síntomas similares (pústulas, chancros o necrosis en la corteza de dos o más años), que afectan de forma específica a variedades importantes como Williams, Comice y Beurré Hardy, y cuyos agentes patógenos no han sido aún determinados. La identificación de un primer viroide en peral debería facilitar los estudios correspondientes.

Agradecimientos

A Rafael Gella, del SIA de Zaragoza, por proporcionarnos algunos de los materiales de peral utilizados en este trabajo.

Referencias

- Cropley R., 1960. Pear blister canker: a virus disease. Annual Report East Malling Research Station for 1959, 43: 104.
- Desvignes J.C., 1976. The virus diseases detected in greenhouse and in field by the peach seedling GF 305 indicator. Acta Hort. 67: 315-323.
- Desvignes J.C., 1980. Different symptoms of the peach latent mosaic. Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung. 15: 183-190.
- Desvignes J.C., 1986. Peach latent mosaic and its relation to peach mosaic and peach yellow mosaic virus diseases. Acta Hort. 193: 51-57.
- Desvignes J.C., Flores R., Llácer G., 1992. Les maladies de dégénérescence des arbres fruitiers provoquées par des viroïdes. Phytoma 444: 70-74.
- Diener T.O., 1971. Potato spindle tuber "virus". IV. A replicating, low molecular weight RNA. Virology 45: 411-428.
- Flores R., Llácer G., 1988. Isolation of a viroid-like RNA associated with peach latent mosaic disease. Acta Hort. 235: 325-332.
- Flores R., Hernández C., Avinent L., Hermoso de Mendoza A., Llácer G., Juárez J., Arregui J.M., Navarro L., Desvignes J.C., 1992. Studies on the detection, transmission and distribution of peach latent mosaic viroid in peach trees. Acta Hort. 309: 325-330.

- Flores R., Hernández C., Desvignes J.C., Llácer G., 1990. Some properties of the viroid inducing peach latent mosaic disease. *Res. Virol.* 141: 109-118.
- Flores R., Hernández C., Llácer G., Desvignes J.C., 1991. Identification of a new viroid as the putative causal agent of pear blister canker disease. *J. Gen Virol.* 72: 1199-1204.
- Hashimoto J., Koganezawa H., 1987. Nucleotide sequence and secondary structure of apple scar skin viroid. *Nucleic Acids Res.* 15: 7045-7052.
- Hermoso de Mendoza A., Ballester-Olmos J.F., Pina J.A., 1984. Transmission of citrus tristeza virus by aphids (Homoptera, Aphididae) in Spain. In: Proc. 9th Conf. Int. Org. Citrus Virol., Riverside, California, pp. 23-27.
- Hernández C., Flores R., Llácer G., Desvignes J.C., 1992. Evidences supporting a viroid etiology for pear blister canker disease. *Acta Hort.* 309: 319-324.
- Juárez J., Arregui J.M., Camarasa E., Cambra M., Llácer G., Ortega C., Ortega V., Navarro L., 1988. Recovery of virus-free peach trees from selected clones by shoot-tip grafting in vitro. *Acta Hort.*, 235: 77-83.
- Koganezawa H., Yanase H., Sakuma T., 1982. Viroid-like RNA associated with apple scar skin (or dapple apple) disease. *Acta Hort.* 130: 193-197.
- Sano T., Hataya T., Terai Y., Shikata E., 1989. Hop stunt viroid strains from dapple fruit disease of plum and peach in Japan. *J. Gen. Virol.* 70: 1311-1319.
- Semancik J.S., Weathers L.G., 1972. Exocortis disease: Evidence for a new species of "infectious" low molecular weight RNA in plants. *Nature New Biol.* 237: 242-244.